

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biochemie
Studijní obor: Biochemie



David Jurnečka

Expres a purifikace N-koncové části filamentózního hemaglutininu z *Bordetella pertussis*
v *E. coli*

Expression and purification of N-terminal fragment of filamentous hemagglutinin from
Bordetella pertussis in *E. coli*

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.
Školitel: Mgr. Ladislav Bumba, Ph.D.

Praha 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne.....Podpis.....

Poděkování :

V první řadě bych rád poděkoval svému školiteli Mgr. Ladislavu Bumbovi, Ph.D. za cenné rady, profesionální přístup a trpělivost při vedení mé bakalářské práce. Dále doc. Ing. Peteru Šebovi, CSc. za možnost pracovat v Laboratoři molekulární biologie bakteriálních patogenů MBÚ AV ČR a také všem jejím členům. Rád bych také poděkoval Prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za finální korekturu této práce. Rovněž patří můj dík rodině za podporu po celou dobu mého studia.

Abstrakt :

Černý kašel je vysoce nakažlivé onemocnění způsobené gramnegativní bakterií *Bordetella pertussis*. V průběhu infekce bakterie produkuje celou řadu toxinů a adhezivních molekul, mezi něž patří i filamentózní hemagglutinin (FHA). FHA je 220 kDa povrchový protein, jenž je také produkován ve velkém množství do média, a hraje klíčovou úlohu v interakci mezi bakterií a hostitelskými buňkami. Cílem této práce bylo vytvořit heterologní expresní systém na produkci N-koncové části *B. pertussis* FHA (FHA1-862) v buňkách *Escherichia coli*. Pro sekreci proteinu FHA1-862 do media byl vytvořen plasmid skládající se ze systému dvou nezávislých T7/Lac promotorů, první pro gen *fhaB* kódující FHA1-862, a druhý pro gen *fhaC* kódující transportní protein, jenž umožňuje přenos FHA z periplasmatického prostoru do extracelulárního média. Protein byl úspěšně sekretován v buňkách *E. coli* BL21 nesoucí plasmid pMM100 (LacI^q) při 30 °C a přečištěn pomocí afinitní kapalinové chromatografie na nosiči Cellufine. Tyto výsledky naznačují, že protein FHA862 může být produkován expresním systémem *E. coli*, nicméně tento systém poskytuje malou výtěžnost proteinu.

Klíčová slova: *Bordetella pertussis*, *Escherichia coli*, filamentózní hemagglutinin

Abstract :

Whooping cough is highly contagious disease caused by gram-negative bacteria *Bordetella pertussis*. During infection the bacteria produces many types of toxins and adhesive molecules including a filamentous hemagglutinin(FHA). FHA is 220 kDa surface-exposed and secreted protein, which plays a key role in host-cell interactions. The project aims at construction of heterologous expression system for production of the N-terminal part of *B. pertussis* FHA (FHA1-862) in *E. coli*. The expression vector is composed of system of two independent T7/Lac promoters and enables secretion of FHA1-862 into the culture media. Downstream of the first promoter is *fhaB* gene encoding FHA1-862 and the latter is followed by *fhaC* gene encoding the FhaC transport protein, which allows translocation of FHA from periplasmic space to extracellular milieu. FHA1-862 was successfully secreted in *E. coli* strain BL21 carrying plasmid pMM100 (LacIq) at 30 °C and purified by affinity chromatography on Cellufine resin. These results indicate that FHA1-862 protein can be produced in *E. coli*, however, the system is inefficient and the yield of the protein is very low.

(In Czech)

Key words: *Bordetella pertussis*, *Escherichia coli*, filamentous hemagglutinin

Osnova:

1. Seznam zkratk	8
2. Úvod	9
2.1. Černý kašel	10
2.1.1. Diagnostika rizika černého kašle	11
2.2. Vakcinace proti černému kašli	11
2.3. Původce černého kašle – <i>Bordetella pertussis</i>	11
2.3.1. Virulentní faktory	13
2.3.2. Pertusovýtoxin	14
2.3.3. Adenylát cyklázový toxin	14
2.3.4. Dermonekrotickýtoxin	15
2.3.5. Cytotracheálnítoxin	16
2.3.6. Lipooligosacharid <i>B.pertussis</i>	16
2.3.7. Pertaktin a fimbrie	17
2.3.8. Filamentózníhemaglutinin	17
3. Cíl práce	23
4. Materiál a metody	24
4.1. Materiál	24
4.1.1. Laboratorní vybavení	24
4.1.2. Chemikálie	24
4.1.3. Roztoky	26
4.1.4. Enzymy	29
4.1.5. Kultivační média	29
4.1.6. Bakteriální kmeny	30
4.1.7. Plasmidy	30
4.2. Metody	31
4.2.1. Transformace bakterií	31
4.2.2. Příprava LB agaru pro pěstování <i>E. coli</i>	31
4.2.3. Izolace plasmidovéDNA	32
4.2.4. Minipreparaceplasmidové DNA	33
4.2.5. Kultivace bakterií v tekutém médiu	33

4.2.6. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	34
4.2.7. Příprava agarosového gelu.....	36
4.2.8. Příprava polyakrylamidového gelu.....	37
4.2.9. Elektroforéza na agarosovém gelu.....	37
4.2.10. Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu.....	38
4.2.11. Izolace fragmentů DNA z gelu.....	38
4.2.12. Specifická imunodetekce proteinu na membráně.....	39
4.2.13. Štěpení dsDNA.....	40
4.2.14. Ligace dsDNA.....	41
4.2.15. Komplementace dsDNA ze dvou ssDNA.....	41
4.2.16. Exprese rekombinantního proteinu.....	42
4.2.17. Purifikace rekombinantního proteinu.....	42
5. Výsledky.....	44
5.1. Příprava plasmidu pT7T7adFhaBFhaC.....	44
5.2. Exprese a purifikace FHA1-862 v buňkách <i>E.coli</i>	50
6. Diskuze.....	53
7. Závěr.....	55
8. Literární zdroje.....	56
8.1. Přehled použitých obrázků.....	61

1. Seznam zkratk

AA	Aminokyselina
ACT	Adenylát cyklázový toxin
APS	Peroxodisíran amonný
APV	Nebuněčná pertusová vakcína (z angl. acellular pertussis vaccine)
ATP	Adenosintrifosfát
BSA	Hovězí sérový albumin
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
CPV	Celobuněčná pertusová vakcína (z angl. whole cell pertussis vaccine)
DNT	Dermonekrotický toxin
GTP	Guanosintrifosfat
gDNA	genomová DNA
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
Fha	Filamentózní hemagglutinin
IL	Interleukin
LB	Luria-Bertani (medium)
mRNA	mediátorová RNA (z angl. messenger RNA)
kDa	Kilodalton
OD	Optická densita
PBS	Fosfátový pufr s 0,15 M NaCl (z angl. Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)

pDNA	plasmidová DNA
PT	Pertusový toxin
RGD	Tripeptid aminokyselin arginin, glycin, aspartát
RTX	Repeats in toxin – opakování v toxinu
SDS	Dodecylsírán sodný
TBE	Pufr – Tris/Kyselina boritá/EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TCT	Tracheální cytotoxin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

2. Úvod

Černý kašel – Pertuse, je ve světě dlouhodobým problémem, který se v posledních letech vrací také do České republiky. Celosvětově postihne toto onemocnění ročně 35-40 miliónů lidí a z toho cca 300 tisíc z nich zahyne. Před zavedením očkování byl černý kašel jednou z nejzávažnějších nemocí zasahujících především kojence a batolata. V posledních letech ovšem výskyt pertuse mění svůj epidemiologický charakter, postihuje zejména adolescenty a všeobecně častěji i vyšší věkové skupiny. Nebezpečnost této nemoci je především v tom, že většina usmrčených novorozenců, se nakazila kontaktem s již infikovanými dospělými, a často rodinnými příslušníky, pro které má tato nemoc mírnější průběh a nebývá spojena s fatálními následky. Vývoji účinné a kvalitní vakcíny se proto v poslední době přikládá velký význam a do projektů tohoto zaměření se zapojuje velká většina států v Evropě i Americe a také Japonsko.

2.1. Černý kašel

Světová zdravotnická organizace popisuje pertuse, jako kašel, který má trvání déle než 21 dní. Je vysoce nakažlivým onemocněním přenášeným vzdušnou cestou převážně kýcháním, kašláním nebo kontaktem s předměty, jež byly čerstvě potřísněny sekretem infikované osoby [1]. Bakteriální infekce poté kolonizuje dýchací cesty. Inkubační doba je mezi 7-14 dny. V katarální fázi se podobá běžnému nachlazení. Postižený má mírně zvýšenou teplotu, suchý dráždivý kašel, rýmu a trpí nechutenstvím. Postupně se mohou dostavit záchvaty kašle, dávení nebo zvracení. Průběh nemoci vede k dehydrataci a těžkému vyčerpání. Paroxysmální fáze trvá 3-5 týdnů a zhoršují se v ní záchvaty kašle, způsobené nejen zánětem dýchacích cest ale také uvolňováním a působením pertusového toxinu (PT) [2]. Tato fáze většinou již není doprovázena horečkou. Na vrcholu onemocnění má postižený oteklý obličej a překrvené spojivky. K těžším průběhům nemoci patří komplikace spojené se záněty mozku, plic, středního ucha a se silnými křečemi. Dávivý kašel se neprojevuje tak silně u adolescentů a dospělých, kteří pak mohou příznaky a léčení pertuse podcenit a považovat jej za běžné nachlazení. Nemoc se tedy může dále přenášet k nejvíce ohrožené skupině, a to k novorozencům [3]. Při podání antibiotik se bakterie úspěšně likvidují, ale délka nemoci a kašle se tím nezkracuje, nýbrž zmírňuje. Je

třeba podávat ještě léky utišující, případně kyslíkovou léčbu. Ztráta tekutin vyvolaná zvracením se nahrazuje umělou výživou podanou do žíly.

2.1.1 Diagnostika a rizika černého kašle

Pertuse se nejčastěji diagnostikuje přímou detekcí patogenu v dýchacích cestách. Kultivace bakterií vykazuje velmi vysokou specifitu, avšak senzitivita je velmi často závislá na kvalitě odběru vzorku. Většinou se jedná o přímý laryngeální stěr suchým vatovým tampónem a následnou kultivací bakterií. Je možno také využít imunofluorescence nebo polymerázové řetězové reakce (PCR). Poslední jmenovaná metoda je velmi specifická i senzitivní, ale bývá u ní problém s rozlišením jednotlivých kmenů rodu *Bordetella*. Patogen lze detekovat i nepřímo využitím serologických nebo imunologických metod. Ačkoli po zavedení očkování nebylo na našem území zaznamenáno úmrtí spojené s touto nemocí, její výskyt alarmujícím tempem stoupá. V ČR počet případů nakažení černým kašlem v roce 2008 stoupl oproti roku 2007 pětkrát a v posledních čtyřech letech si udržuje vysokou incidenci [4]. Velkým problémem je pertuse převážně v rozvojových zemích a v těch, ve kterých se nedostatečně očkuje. Mezi ně patří valná většina zemí v Africe a v posledních letech také USA a Austrálie.

2.2. Vakcinace proti černému kašli

Celobuněčné pertusové vakcíny (CPV) se velmi dobře osvědčily v prevenci onemocnění a snížení počtu infekcí vyvolaných *B. pertussis*. Využívají inaktivovaných celých buněk *B. pertussis*, které jsou jako vakcinace velice účinné, ale vyvolávají nezanedbatelné vedlejší účinky. Patří mezi ně lokální reakce v místě vpichu, ať už je to bolest, zrudnutí nebo erytém. Často se objevuje horečka přesahující 38°C, rozmrzelost, apatie a u dětí také neustálý neutišitelný křik [5]. Vzácně se mohou také vyskytnout vysoké horečky přes 40°C, křeče a kolaps. Nebuněčné pertusové vakcíny (APV) vznikly separací a užitím jednotlivých antigenů *B. pertussis*, jež zajišťují prevenci onemocnění vyvoláním specifické imunitní odpovědi. Mezi zmiňované antigeny patří pertusový toxin, filamentózní hemagglutinin, pertaktin a fimbrie. Při porovnání má APV nižší výskyt nežádoucích účinků při srovnatelné účinnosti [6]. Její efektivita je dána počtem aktivních antigenních složek, jako nejúčinnější

se tedy jevíly vícesložkové APV. Se zvýšením počtu případů po zavedení APV se ale v poslední době opět klade důraz na vývoj kvalitní CPV.

Pro představu účinnosti vakcinace můžeme uvést počet případů pertuse v USA. Před započítáním vakcinace v letech 1940-1945 bylo hlášeno více než 147000 případů nakažení dávivým kašlem a z toho 8000 obětí tomuto onemocnění podlehl. V roce 1976 už to bylo pouze 1010 případů, což je současně nejnižší počet hlášených případů v americké historii. V posledních letech počet nakažených roste, v roce 2009 čítal 16858 případů. Charakter této nákazy se ovšem mění [7]. Má mírnější průběh, ale více komplikací a téměř polovina nakažených patřila do skupiny adolescentů nebo dospělých. Tato skutečnost se nezdá být tak alarmující, jelikož, jak už bylo uvedeno, u vyšších věkových skupin probíhá pertuse v mírnější formě. Nicméně opak je pravdou. Je totiž větší pravděpodobnost, že dospělý jedinec, v domnění nachlazení, nevyhledá vhodnou lékařskou pomoc. Správně se neléčí a nechtěně tak vytváří rezervoár k dalšímu rozšiřování nemoci na náchylnější jedince. V České republice bylo hlášeno přes 30000 nemocných a 50 úmrtí před započítáním vakcinace v roce 1958. Po očkování se na našem území neobjevil jediný případ úmrtí až do roku 2004, kdy černému kašli podlehl čtyřměsíční dítě. V současné době se u nás provádí očkování Hexavakcínou, která poskytuje ochranu proti tetanu, záškrtu, černému kašli, invazivním onemocněním vyvolaným bakterií *Haemophilus influenzae* typu b, proti virové hepatitidě typu B a proti přenosné dětské obrně. První vakcína se aplikuje 2. měsíc po narození dítěte, ve 4. a 6. měsíci se přidávají 2 „boostery“ a nejdéle po šesti měsících od poslední dávky se aplikuje 4. vakcína. Přeočkování se poté ještě provádí mezi 5. a 6. rokem dítěte. Rezistence proti černému kašli získaná vakcinací není celoživotní. Účinnost protekce pomocí CPV je mezi 6-10 lety a pro APV mezi 5-8 lety od posledního boosteru [8]. S ohledem na stále vzrůstající výskyt černého kašle v rozvinutých zemích by měl být kladen důraz na plošné přeočkování dospělé populace.

2.3. Původce černého kašle – *Bordetella pertussis*

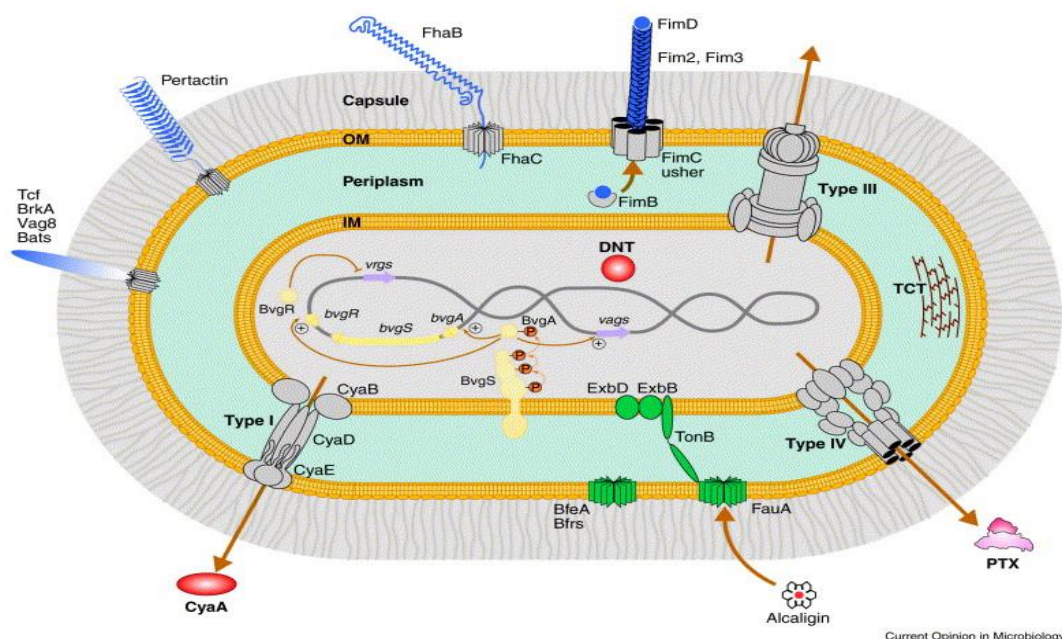
Černý kašel je způsoben gram-negativní, nepohyblivou, ovoidní, krátkou tyčkou zvanou *Bordetella pertussis*. V laboratorních podmínkách ji lze vypěstovat na Bordet-Gengově půdě, která se skládá z bramborového extraktu, beraní krve, glycerinu a penicilinu G (c = 0,5 mg/l) [9]. Kolonie rostou 36-72 hodin a jsou perleťově lesklé a průsvitné. Virulentní

kmeny vykazují na krevním agaru většinou hemolýzu. *B. pertussis* je striktně aerobní mikroorganismus, slabě štěpí glycidy a roste ve 4 fázích. Nejvýznamnější je 1. fáze, při které dochází k opouzdření K-antigenem a ke kompletnímu antigennímu vybavení [10]. Je obligátním parazitem, který nevydrží dlouho mimo organismus a za přirozených podmínek osidluje pouze lidské epiteliální buňky trachey a bronchů. Neproniká do krve, ale po kolonizaci se začne velmi rychle množit a blokovat funkci řasinek. Má jedinečné postavení mezi infekčními bakteriemi díky velkému množství virulentních faktorů.

V rodu *Bordetella* můžeme nalézt ještě 2 významné zástupce. *Bordetella parapertussis* je také schopna osidlovat lidský dýchací trakt. Vyvolává onemocnění podobné černému kašli, avšak s lehčím průběhem [11]. *Bordetella bronchiseptica* osidluje dýchací trakt převážně malých savců. Infekce tímto kmenem je u člověka velmi nepravděpodobná, ale byla již zaznamenána [12].

2.3.1. Virulentní faktory

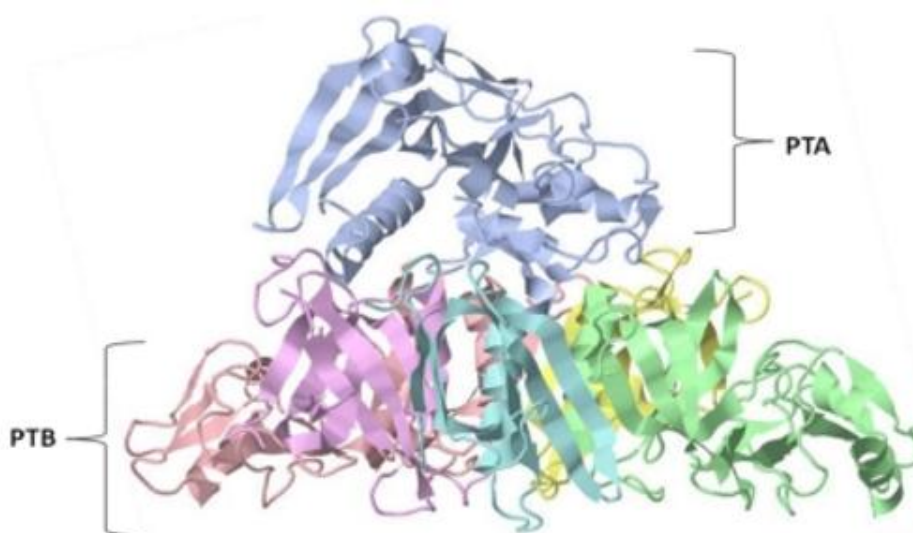
Mezi virulentní faktory patří především toxiny a adhesiny. Z toxinů jsou to adenylát cyklázový toxin (CyaA), pertusový toxin (PTX), cytotracheální toxin (TCT), dermonekrotický toxin (DNT) a z adhesinů je to zejména filamentózní hemaglutinin (FHA) a pertaktin (PRN). Produkci virulentních faktorů řídí systém složený z regulátoru BvgA a sensorového proteinu BvgS [13].



Obr. 2.1. Detailní pohled na virulentní faktory *B. pertussis*. Převzato z [1]

2.3.2. Pertusový toxin

Pertusový toxin (PTX) je 105 kDa proteinový oligomer řadící se mezi AB₅ exotoxiny. Tyto toxiny jsou složeny z vazebné podjednotky B a enzymově aktivní podjednotky A. Podjednotka B pertusového toxinu (PTB, Obr. 2.2) rozpoznává specifické cukry na buněčných površích a sérových glykoproteinech. Po vazbě na receptor dojde k translokaci podjednotky A do cytoplasmy, kde katalyzuje ADP-ribosylaci podjednotky α_i proteinu G. V buňce tak dochází k narušení signalizace [14] a zvýšení koncentrace cAMP [15]. PT způsobuje v infikovaném organismu hypoglykémii, což může vést k poruchám CNS, zvýšení citlivosti na histamin a zesílení kapilární permeability [16].

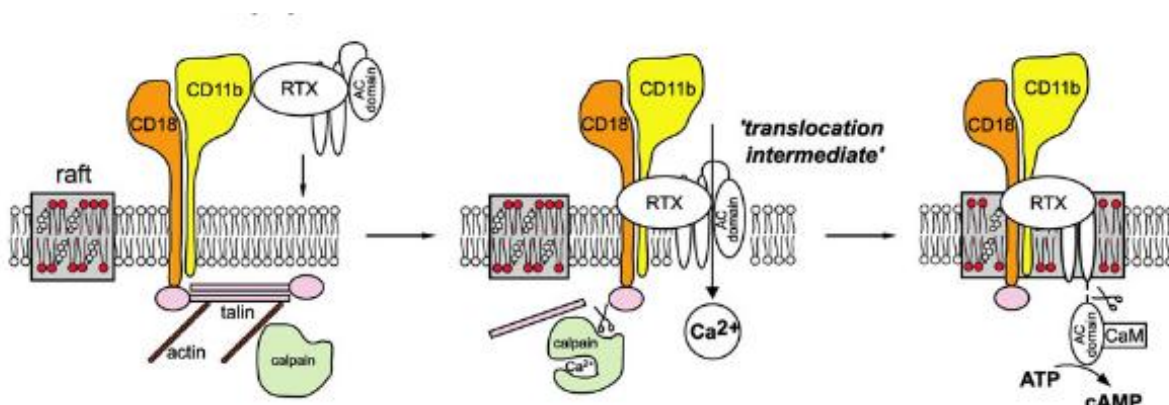


Obr.2.2. Krystalová struktura hexameru pertusového toxinu. Převzato z [2]

2.3.3. Adenylát cyklázový toxin

Adenylát cyklázový toxin (CyaA) s 1706 aminokyselinami patří do skupiny takzvaných Repeats-in-toxin (RTX) exoproteinů s velikostí od 40 – 600 kDa, které se vyskytují u Gram-negativních bakterií. Jejich společným znakem je unikátní druh přenosu přes bakteriální membránu pomocí sekrečního systému typu I (T1SS) a charakteristické opakování typicky nonapeptidových glycin-aspartátových repetitivních sekvencí umístěných na C-koncové části proteinů. Tyto sekvence mají významnou funkci při vazbě iontů Ca^{2+} , napomáhají ke správnému skládání proteinu a adekvátní funkční konformaci v extracelulárním prostoru [17]. ACT se váže na integrin $\alpha_M\beta_2$ (CD11/CD18, CR3, Mac-1) myeloidních

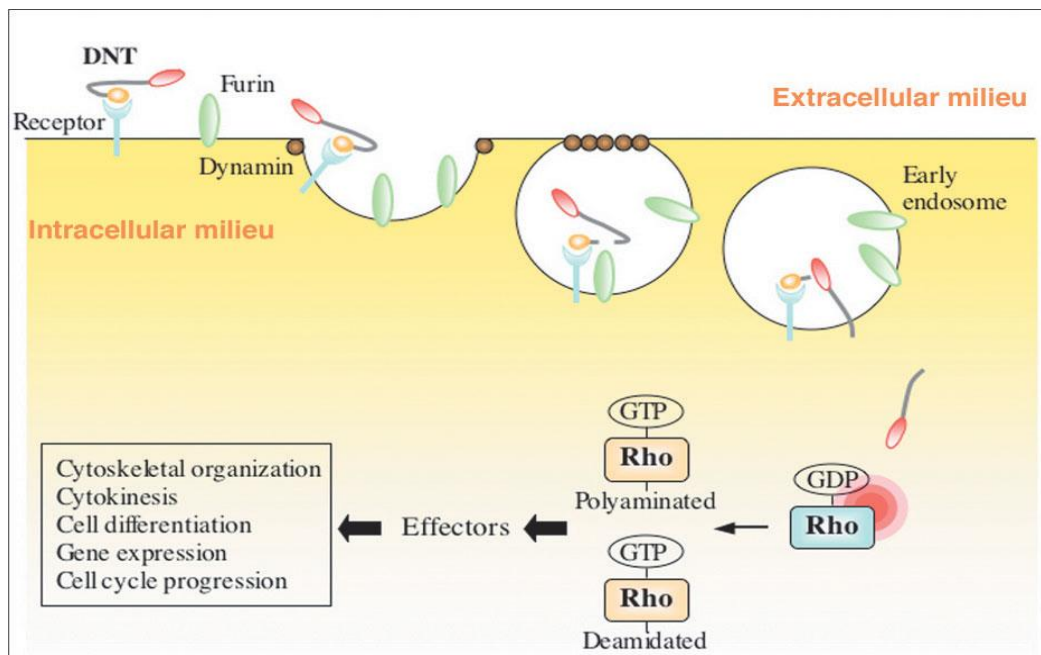
fagocytů. Je schopen přenést do cílové buňky, bez pomoci jiných molekul, enzym adenylátcyklázu, který se nachází v prvních 400 N-terminálních aminokyselin toxinu. Po vazbě intracelulárního kalmodulinu katalyzuje zmíněný enzym nekontrolovanou přeměnu ATP na klíčovou signální molekulu cAMP, čímž oslabuje baktericidní schopnosti infikovaných imunitních buněk [18].



Obr. 2.3. Mechanismus průniku ACT membránou – 1) Navázání na integrin $\alpha_M\beta_2$ a inserce do membrány, 2) Vstup iontů Ca^{2+} do buňky a štěpení talinu, 3) Translokace AC-domény přes cytoplazmatickou membránu. Převzato z [3]

2.3.4. Dermonekrotický toxin

Dermonekrotický toxin (DNT) je protein o molekulové hmotnosti 150 kDa důležitý při iniciační fázi bakteriální kolonizace, kvůli jeho silným vasokonstrikčním účinkům [19]. Je schopen ovlivnit transglutaminázu, enzym, který katalyzuje tvorbu i kovalentní vazby mezi volnou amino-skupinou a γ -carboxyamidovou skupinou proteinu nebo peptidu vázaného na glutamin. Tato aktivita DNT katalyzuje polyaminaci nebo deaminaci malých GTPáz z podskupiny Rhó. Modifikovaná GTPáza ztrácí svou hydrolytickou aktivitu, a tím se snižuje frekvence signálů vysílaných k efektorům. Endocytóza je nutná k začlenění toxinu do buňky, kde poté proběhne jeho proteolytické štěpení a vstup do cytoplazmy a ovlivnění GTPázy [20].



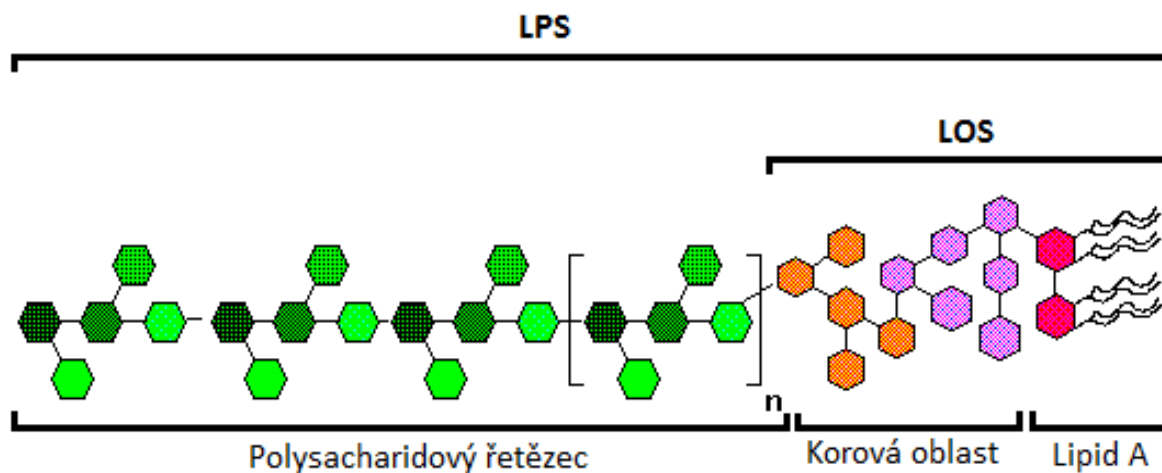
Obr. 2.4. Mechanismus, kterým DNT vniká do buňky a deaminuje/polyaminuje GTPázu z podskupiny Rhó. Převzato z [4].

2.3.5. Cytotracheální toxin

Cytotracheální toxin (TCT) je nízkomolekulární glykopeptid o velikosti 91 Da a je součástí peptidoglykanu sekretovaného *B. pertussis*. Inhibuje proliferaci buněk plicního epitelu tím, že vyvolává produkci oxidu dusnatého a Interleukinu-1 (IL-1) [21]. IL-1 je cytokin, který se podílí na regulaci imunitních dějů. V nízkých koncentracích vyvolává akutní fázi zánětu, ve vyšších funguje jako pyrogen (vyvolává horečku).

2.3.6. Lipooligosacharid *B. pertussis*

Lipooligosacharid (LOS) je varianta glykolipidu lipopolysacharidu (LPS) u gram-negativních bakterií, lišící se délkou cukerného řetězce (Obr. 2.5.). Obecně jsou to molekuly skládající se z lipidů a polysacharidů spojených kovalentní vazbou. Je to hlavní složka vnější cytoplasmatické membrány. LOS ovlivňuje imunoregulační aktivitu dendritických buněk. Chrání je před apoptózou, prodlužuje jejich životnost a funkčnost. LOS se vyskytuje u všech 3 dříve zmíněných kmenů rodu *Bordetella* a obecně u bakterií, jež kolonizují slizniční epitel [22].



Obr. 2.5.: Schematické znázornění LPS a LOS. Lipid A je fosforylovaný glukosaminový disacharid s několika mastnými kyselinami, které ukotvují LOS/LPS v bakteriální membráně. Kórová oblast je tvořena 2-keto-3-deoxyacetátem (KDO) a heptózami. LOS obsahuje oproti LPS jen velmi krátký cukerný řetězec za kórovou oblastí. Převzato z [5] a upraveno

2.3.7. Pertaktin a fimbrie

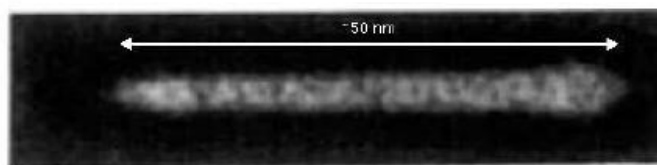
Mezi adhesiny patří pertaktin (PRN) a fimbrie. Pertaktin patří mezi membránové proteiny, má velikost 60,4 kDa a je exprimován všemi virulentními kmeny *B. pertussis*. Je tvořen z prekurzoru o velikosti 910 AA. Prvních 34 AA z N-koncové části slouží jako signální peptid, charakteristický pro proteiny, jež jsou transportovány do vnější membrány. Obsahuje sekvenci RGD, která zprostředkovává interakci extracelulárních proteinů s integriny. Tato interakce má velký vliv na přichycení buněk a jejich pohyblivost [23].

Fimbrie (FIM) jsou jemné vláknité výrůstky, které můžeme nalézt ve velkém množství na povrchu mnoha gram-negativních bakterií. U *B. pertussis* slouží ke stabilizaci přichycení na řasinkový epitel v horních cestách dýchacích [24]. Oba výše uvedené adhesiny jsou používány jako složka acelulárních vakcín.

2.3.8. Filamentózní hemagglutinin

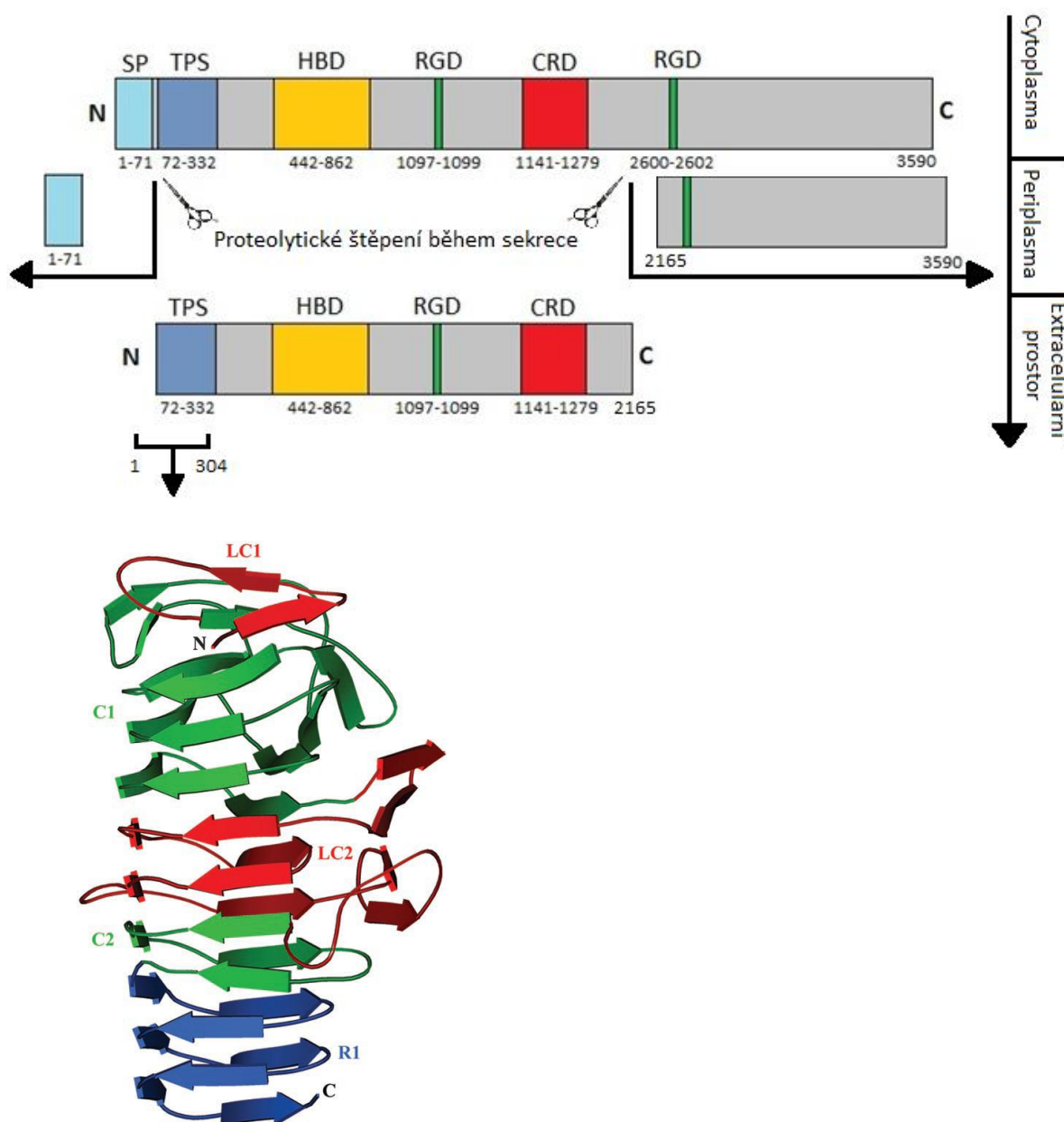
Filamentózní hemagglutinin (FHA) je hlavním adhesinem *B. pertussis* [25]. Je tvořen z prekurzoru o velikosti 367 kDa. Plně aktivní protein má díky proteolytickému štěpení během sekrece velikost 220 kDa a může být přichycen na povrchu buňky nebo sekretován

do extracelulárního prostoru. Zajišťuje přilnutí bakterií *B. pertussis* na lidské monocyty [26]. Tvarem připomíná sponku o velikosti 50 nm (Obr. 2.6) [27].



Obr. 2.6.: Molekula FHA zobrazená pomocí negativního barvení v transmisní elektronové mikroskopii. Převzato z [6]

FHA obsahuje několik signálních a vazebných sekvencí (Obr. 2.7, str. 19). Signální peptid (SP) slouží k přenosu FHA přes vnitřní buněčnou membránu, TPS modul pak k interakci s partnerským proteinem FhaC a sekreci přes vnější cytoplasmatickou membránu. Mezi vazebné domény patří cukerná vazebná doména (CRD), která pravděpodobně zprostředkovává vazbu na buňky řasinkového epitelu a makrofágy [28], a heparin-vazebná doména (HBD) se váže na sulfáty hojně zastoupené na buněčných površích [29]. Dvě sekvence RGD (Arg-Gly-Asp) jsou odpovědné za interakci s integriny a s nimi asociovanými proteiny (LRI, integrin $\alpha\beta 3$, IAP, CD 47) [30].

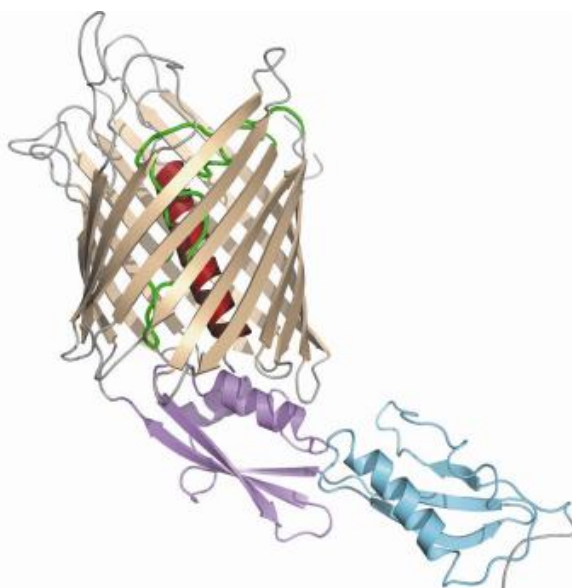


Obr. 2.7.: Schematický náčrtek dvoukrokové proteolytické úpravy FHA během sekrece a krystalová struktura 30 kDa N-koncového části FHA. Převzato z [7]

FHA nese na N-koncové části doménu TPS o velikosti 250 AA nalezenou u více než 100 proteinů. Její struktura byla vyřešena díky krystalizaci 30 kDa N-koncového fragmentu FHA. Jak je vidět na Obr. 2.7. modul TPS je složen do formy β -helixu s několika extrahelikálními motivy. Obsahuje dvojice podobných regionů C1,C2 a LC1,LC2 (Obr. 2.7) které jsou nezbytné pro sekreci transportovaného proteinu skrz vnější cytoplasmatickou membránu [31]. Oblast R1 (Obr. 2.7) už odpovídá první z N- koncových 19 AA repetitivních

sekvencí FHA. Správné složení modulu TPS pomocí sekvencí C a LC je esenciální pro stabilizaci proteinu a jeho následné složení do formy β -helixu [32]. N-koncová pozice signálního modulu je preferována pro přenos přes vnější membránu a zabraňuje agregaci a degradaci proteinu v periplasmě.

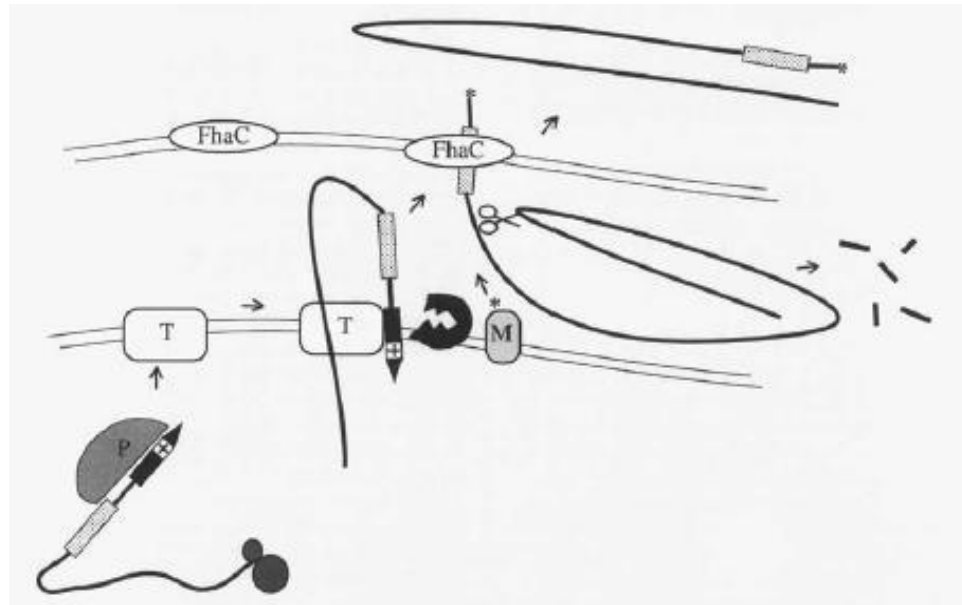
Bakterie využívají velké množství sekrečních systémů (I-VIII) dovolující export proteinu mimo její buňku. FHA patří mezi nejefektivněji sekretované proteiny mezi gram-negativními bakteriemi. Je sekretován pomocí TPS (two-partner secretion) [33]. Jedná se o interakci dvou partnerských proteinů. TpsA (FhaB) je sekretovaný protein interagující s TpsB (FhaC) proteinem, který zprostředkovává transport přes vnější membránu. FhaC patří mezi proteiny skupiny Omp85-TpsB. Tyto transportéry jsou zodpovědné za přenos β -helikálních proteinů zvaných TpsA, které jsou většinou virulentní faktory gram-negativních bakterií, přes vnější cytoplazmatickou membránu. Tyto proteiny obsahují C-koncový transmembránový β -barel a rozpustný N-koncový region zakotvujících 1 až 5 polypeptidových transportních domén (Obr. 2.8) [34].



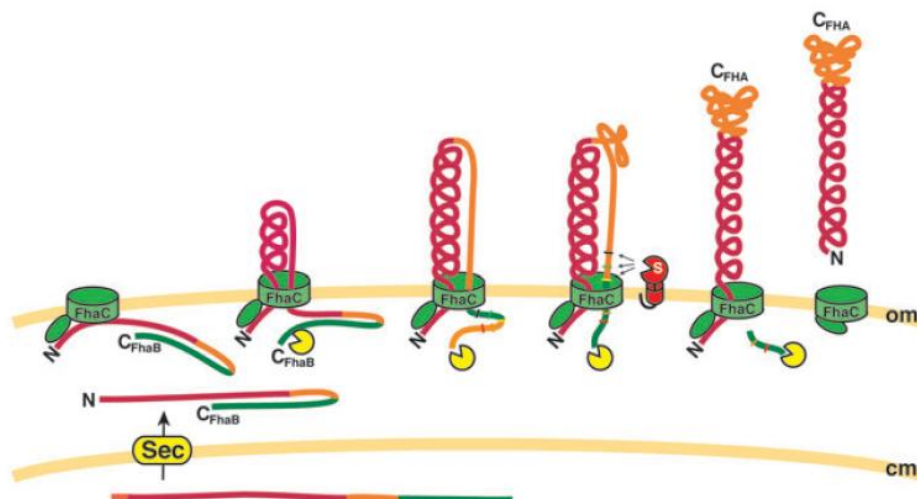
Obr. 2.8. Krystalová struktura FhaC. Převzato z [8]

Byly navrženy 2 modely sekrece FHA lišící se v mechanismu průchodu proteinu přes vnější buněčnou membránu. Prvním je starší model z roku 1996 (Obr. 2.9.) Prekurzor FHA o velikosti 367 kDa je veden pomocí signální sekvence (SP) systémem Sec [35] přes vnitřní cytoplazmatickou membránu. Při nebo po průchodu přes membránu dochází k odštěpení 71 AA z N-koncové části. Protein je poté aktivován a TPS doména rozpoznává FhaC

zakotvené ve vnější cytoplazmatické membráně. Protein je následně sekretován skrz FhaC do extracelulárního prostoru N-koncovou částí napřed. Během tohoto procesu dochází k odštěpení 150 kDa C-koncového fragmentu a sekretovaný protein může zaujmout typický tvar sponky (Obr. 2.6., str. 18) [27].



Obr. 2.9.: 1. model mechanismu sekrece FHA (1996). Systém Sec je reprezentován P – pilotním protein a M – modifikačním enzymem. Převzato z [9]



Obr. 2.10: 2. model mechanismu sekrece FHA (2006) [10]

U druhého modelu (Obr. 2.10.) z roku 2006 je prekurzor FHA nejdříve pomocí signální sekvence (SP) rozpoznán v cytoplazmě a veden přes cytoplazmatickou membránu pomocí systému Sec [35]. Signální sekvence (SP) je poté odštěpena, čímž dojde k aktivaci proteinu a rozpoznání pomocí FhaC. N-koncové části FHA a FhaC spolu interagují a zůstávají propojeny během sekrece proteinu přes vnější cytoplazmatickou membránu. Během tohoto procesu je odštěpen poslední 150 kDa C-koncové části FHA SphB1 proteázou. Protein je sekretován nebo prezentován na povrchu buňky C-koncovou globulární částí. Model předpokládá, že počáteční složení FHA do tvaru sponky je nutné pro sekreci proteinu a poskytuje dostatečnou energii k translokaci C-koncové části skrz FhaC. Odštěpený C-koncový peptid o molekulové hmotnosti 150 kDa slouží pravděpodobně jako chaperon, zajišťující správné složení zbytku proteinu [36]. V závislosti na struktuře domény TPS a její nepostradatelnosti při složení proteinu jsou proteiny TpsA pravděpodobně sekretovány ven z buňky vertikálně od N k C konci [31].

FHA obsahuje 2 imunoprotektiní regiony s epitopy. První se nachází v C-koncové části mezi posledními 400 AA sekretovaného proteinu. Druhý region je situován v N-koncové části [37]. Při imunodetekci u 220 kDa FHA je ale pro protilátky N-koncový epitop stericky chráněn kvůli specifickému složení proteinu [36]. Prvních 862 AA z N-konce FHA obsahuje všechny sekreční signály nutné k expresi, jak tohoto fragmentu tak i kompletního FHA. Ačkoliv obsahuje heparin-sulfát-vazebnou doménu, nezajišťuje dostatečné přichycení bakterií na epiteliální buňky nebo makrofágy. Infekce pomocí *B. pertussis* sekretující pouze FHA1-862 místo kompletního FHA neindukuje produkci anti-FHA-protilátek. Ta může být ale pozorována při intranasální imunizaci myší pomocí purifikovaného proteinu FHA1-862 [38].

3. Cíl práce

- příprava vektoru pro heterologní expresi fragmentu 1-862 z N-koncové části filamentózního hemagglutininu z *B. pertussis* v *E. coli*
- exprese a následná purifikace N-koncové části filamentózního hemagglutininu 1-862 pomocí afinitní chromatografie z kultivačního média *E. coli*

4. Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1. Laboratorní vybavení

Centrifuga Eppendorf 5415 R, Eppendorf AG, SRN.

Centrifuga Biofuge pico, Heraeus Instruments, SRN.

Centrifuga Universal 32 R, Hettich Zentrifugen, SRN.

Centrifuga Sorvall RC26 Plus, Du Pont Instruments, USA.

Centrifuga Rotanta 406 R, Hettich Zentrifugen, SRN.

Digitální analytické váhy AB-104 S, Mettler Toledo, USA.

Digitální váhy HF-2000G, A&D Weighing, USA.

Elektroforéza Mini-PROTEAN II, Bio-Rad, USA.

ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare Life science, UK.

Laboratorní třepačka LT-2, Kavalier, ČR.

pH-metr inoLab Level 1, WTW, SR

Programmable Thermal Controller PTC-100, Bio-Rad, USA.

Mrazicí box (–80 °C), Jouan, Francie.

Mrazicí box (–20 °C), Liebherr, Švýcarsko.

Spektrofotometr SECOMAM S.250I+, ALC-SECOMAM, Francie.

Termostatovaná vodní lázeň Assistant 3180, Karl Hecht GmbH&Co KG, SRN.

Transluminátor G:BOX, Syngene, UK.

Třepačka MaxQ 5000, Thermo Scientific, USA.

Vortex MS2 minishaker, IKA-Works, Inc., USA.

Zařízení pro Western blot Semiphor, Hoefer, USA.

Zdroj pro elektroforézu PowerPac Basic Power Supply, Bio-Rad, USA.

4.1.2. Chemikálie:

β -merkaptoethanol, Calbiochem, SRN.

Akrylamid, Serva, SRN.

Ampicilin, Biotika, SR.

Bacto-trypton, Oxoid, UK.

Bakteriologický agar, Oxoid, UK.

Bromfenolová modř, Sigma-Aldrich, USA.

Coomassie Brilliant Blue R-250, Serva, SRN.

Dihydrogenfosforečnan draselný, Sigma-Aldrich, USA.

Dihydrogenfosforečnan sodný (dihydrát), Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich, USA.

Dithiothreitol (DTT), Serva, SRN.

Dodecylsulfát sodný (SDS), Serva, SRN.

Ethanol, Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), Serva, SRN.

Glycerol, Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Glycin, Serva, SRN.

Hovězí sérový albumin - Albumin Fraktion V (BSA), Carl Roth, SRN.

Hydrogenfosforečnan disodný (dodekahydrát), Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Hydrogenuhlíčitan sodný, Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Chlorid sodný, Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Isopropanol, Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Isopropyl β -D-thiogalaktopyranozid (IPTG), Sigma-Aldrich, USA.

Kvasničný extrakt, Oxoid, UK.

Kyselina octová, Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Methanol, Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Močovina, Sigma-Aldrich, USA.

Pankreatická ribonukleáza (RNáza), Fermentas International Inc., Kanada.

Persulfát amonný (APS), Serva, SRN.

Tetracyklin, Sigma-Aldrich, USA.

Tris-hydrochlorid (Tris-HCl), Serva, SRN.

Tween 20, Sigma-Aldrich, USA.

4.1.3. Roztoky

Sol I:

Glukosa..... 50 mmol/l
Tris-HCl 25 mmol/l
EDTA..... 10 mmol/l

Sterilizuje se autoklávováním (0,12 MPa, 20 minut). Uchovává se při 4°C.

Sol II:

NaOH 0,2 mmol/l
SDS 1% (w/v)

Sol III:

5 mol/l octan draselný 60 ml
Ledová kyselina octová 11,5 ml
Voda 28,5 ml

Uchovává se při 4°C.

Eluční pufr:

Tris-HCl.....10 mmol/l
EDTA.....1 mmol/l

TUS pufr:

Tris-HCl.....50 mmol/l
Močovina.....8 mol/l
SDS..... 1% (w/v)

„Blotovací“ pufr:

pH 8,3

Glycin.....39 mmol/l
Tris.....48 mmol/l
SDS.....0,0375% (w/v)
Methanol.....20% (w/v)

„Nanášecí“ pufr pro SDS-PAGE:

pH 6,8

Tris-HCl 50 mmol/l

DTT 100 mmol/l

SDS 2 % (w/v)

Bromfenolová modř..... 0,1 % (w/v)

Glycerol 10 % (v/v)

Tris-glycinový pufr: pH 8,3

Tris 25 mmol/l

Glycin 250 mmol/l

SDS 0,1 % (w/v)

TE pufr: pH 8,0

Tris-HCl 10 mmol/l

EDTA..... 1 mmol/l

TBE pufr: pH 8,3

Tris-borát..... 90 mmol/l

EDTA..... 2 mmol/l

Činidlo Bradfordové:

Coomassie Brilliant blue R250..... 0,01% (w/v)

Ethanol.....4,7% (v/v)

H₃PO₄.....8,7% (v/v)

Chemiluminiscenční roztok A: pH 8,8

Roztok 1

Luminol (rozpustit v DMSO).....2,5 mmol/l

Tris-HCl.....100 mmol/l

Roztok 2

Kyselina p-kumarová (rozpustit v DMSO).....90 mmol/l

Výsledný roztok A: k 10 ml roztoku 1 přidat 44μl roztoku 2

Chemiluminiscenční roztok B: pH 8,5

H₂O₂.....5,4 mmol/l

Tris-HCl.....100 mmol/l

Před detekcí byly smíchány chemiluminiscenční roztok A a roztok B v poměru 1:1.

Roztoky byly uchovávány při 4°C.

PBS:

pH 7,4

NaCl.....138 mmol/l

KCl.....3 mmol/l

Na₂HPO₄.....12 mmol/l

KH₂PO₄.....2 mmol/l

PBST:

Tween 20.....0,1% (w/v)

v PBS

PBST-BSA:

BSA.....5% (w/v)

Tween 20.....0,1% (w/v)

v PBS

Barvicí roztok pro SDS-PAGE:

Methanol..... 225 ml

Voda 225 ml

Kyselina octová..... 50 ml

Coomassie Brilliant blue G2500,5 g

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE:

Methanol..... 250 ml

Voda 650 ml

Kyselina octová..... 100 ml

NE Pufr 2,3,4, New England Biolabs, USA

T4 DNA Pufr Ligasy, MBI Fermentas, Litva

HF-Pufr DNA Polymerázy, New England Biolabs, USA

GC-Pufr DNA Polymerázy, New England Biolabs, USA

4.1.4. Enzymy:

Phusion High-Fidelity DNA Polymeráza, New England Biolabs, USA

T4 DNA Ligasa, , MBI Fermentas, Litva

AflIII, EcoRI, EcoRV, NdeI, NruI, NsiI, SpeI, New England Biolabs, USA

4.1.5 Kultivační média

LB medium (Luria-Bertani medium):

Bacto-tryptone	10 g
Kvasničný extrakt.....	5 g
NaCl.....	10 g
Deionizovaná voda	ad 1000 ml

MDO:

NaH ₂ PO ₄	1 g
Na ₂ HPO ₄	3 g
NH ₄ Cl	2 g
Na ₂ SO ₄	0,5 g
Thiamin	10 mg
Kvasničný extrakt.....	20 mg
Glycerol	20 mg
Deionizovaná voda	ad 1000 ml

Upraví se na pH 7,0 pomocí 5 mol/l NaOH. Sterilizuje se autoklávováním (0,12 MPa, 20 minut)

4.1.6. Bakteriální kmeny:

B. pertussis Tohama I

E. coli XL-1, Stratagene, USA

E. coli BL21 λ (DE3) , Stratagene, USA

E. coli BL21 pMM100, Stratagene, USA

4.1.7. Plasmidy

pT7CT7ACT1, RNDr. J.Holubova-Hejnova Ph.D., AV ČR

4.2. Metody

4.2.1. Transformace bakterií

Transformace je přijetí cizorodé genetické informace určitým organismem, v tomto případě bakterií. Je to aktivní proces limitovaný schopností bakterie tuto DNA přijímat a velikostí transformované DNA. Mechanismus přijetí DNA spočívá v přichycení na buněčnou stěnu a průniku do cytoplazmy.

Pracovní postup: Nejdříve byly buňky bakterie *E. coli* XL1 vyjmuty z mrazicího boxu (-80 °C) a nechány 10 minut při laboratorní teplotě. Po vyhřátí na cca 22 °C byl přidán 1 µl požadovaného plasmidu do mikrozkušavky s *E. coli*, která byla ponechána v polystyrenové nádobě s ledovou tříští 10 minut. Po uplynutí této doby byla mikrozkušavka přemístěna do vodní lázně o teplotě 37 °C a nechána inkubovat 5 minut. Poté byla přesunuta zpět na 2 minuty na led. Do mikrozkušavky bylo přidáno 1 ml LB média a byla ponechána ve 37 °C 1 hodinu. Mikrozkušavka byla centrifugována při 13000 rpm, 25 °C, 1 minutu, 1 ml supernatantu byl odstraněn a ve zbylých 0,4 ml byl resuspendován pelet, který byl „hokejkou“ rozetřen na agarosovou misku s antibiotikem a ponechán v místnosti s konstantní teplotou 37 °C po dobu 24 hodin.

4.2.2. Příprava LB agaru pro kultivaci *E. coli*

Agar je přírodní polysacharid s vysokou gelující schopností. Ve spojení s LB médiem se využívá jako živné médium pro kultivaci mikroorganismů. Skládá se ze směsi agarosu a agaropektinu. Agarosa je lineární polymer tvořený monomerními jednotkami agarobiosy, což je disacharid, složený z D-galaktosy a 3,6-anhydro-L-galaktopyranosy. Agar taje při 85°C a tuhne při 32-40 °C.

Pracovní postup: LB agar byl připraven smíšením látek uvedených v kapitole 4.1.5. a přidáním 18 g/l bakteriologického agaru. Po autoklávování se uchovává ve 100 ml lahvích v chladicím boxu (4 °C). Po rozehrátí v mikrovlnné troubě se LB agar ochladí, na teplotu vhodnou pro práci (50 °C), pod proudem tekoucí studené vody. Přidá se 0,15 ml ampicilinu (c=100 µg/ml) nebo 0,1 ml tetracyclinu (c=12,5 µg/ml) v závislosti na použitých buňkách. Vzniklá směs byla rozetřena na dno Petriho misek a ty byly uschovány ve 4 °C.

4.2.3. Izolace plasmidové DNA

Podstatou této izolace je kyselá lyze buněk, následné sražení proteinů a gDNA. Negativně nabitá plasmidová DNA se váže na pozitivně nabitě křemičité mikropartikule, jež jsou pipetovány na minikolonku umístěnou na odsávacím zařízení. Následným promytím se DNA zbaví nečistot, a poté se eluuje. DNA izolovaná pomocí „DNA Lego kitu“ je použitelná pro velkou řadu molekulárně biologických technik, jež zahrnují PCR, restriční štěpení, transformaci, transfekci, sekvenování a mnohé další.

Pracovní postup: Na miskou koloniemi *E. coli* byl pipetován 1ml roztoku SOL I (viz. 4.1.3) a pomocí „hokejky“ byl roztok rozetřen a kolonie resuspendovány. Roztok byl poté rozdělen do 3 mikrozkušavek a do každé přidáno 600 µl roztoku SOL II (viz. 4.1.3). U buněk tak došlo k rozpadu a roztok se stal čirým. Po maximálně pěti minutách, aby nedošlo k denaturaci pDNA, bylo do každé mikrozkušavky přidáno 600 µl roztoku SOL III (viz. 4.1.3). Vznikla sraženina, která byla opatrně inverzí promíchána tak, aby zůstala v celku a lépe se tak centrifugovala. Poté byla mikrozkušavka centrifugována při 13000 rpm, 25 °C, 5 minut. Vzniklý supernatant byl přelit do dalších 3 čistých mikrozkušavek a ještě jednou centrifugován při stejných podmínkách. Mezi tím byly na odsávací zařízení „nasazeny“ 2 minikolonky a pipetováno na každou z nich 200 µl křemičitých mikropartikulí (DNA Lego kit, Top-Bio, ČR), které byly podtlakem popuštěny přes minikolonky. Po dokončení centrifugace vzorků byl obsah všech 3 mikrozkušavek přemístěn do větší zkumavky, přidán stejný objem vazebného pufru, jako bylo vzorku. Roztok byl promíchán a nechán 1 minutu stát. Poté byl pod tlakem „prosán“ přes minikolonky a promyt pomocí 7 ml pufru pro „pročištění“ DNA. Minikolonky byly poté umístěny do čistých mikrozkušavek a centrifugovány při 13000 rpm, 25 °C, 1 minutu pro odstranění zbylého promývacího pufru. Poté byly minikolonky opět umístěny do čistých mikrozkušavek a na každou bylo pipetováno 30 µl elučního pufru (viz. 4.1.3). Kolonky 1 minutu stály a pak byly centrifugovány stejně jako v předešlém kroku. Roztok DNA byl umístěn do -20°C, nebo ihned použit pro štěpení.

4.2.4. Minipreparace plasmidové DNA

Pracovní postup: Kolonie *E. coli* s příslušnou ligací DNA vzniklé na Petriho byly jedna po druhé přesunuty pomocí párátko do připravených zkumavek s médiem. Poté byly umístěny na třepačku do 37°C po dobu 18ti hodin. Během této doby v každé zkumavce bakterie „narostly“ tak, že se původně čiré médium výrazně zakalilo a separátně tak vzniklo velké množství DNA každého vybraného klonu. Po uplynutí zmíněných 18ti hodin bylo z každého klonu přeneseno 1,5 ml vzorku do mikrozkmavky a centrifugováno při 13000 rpm, 25 °C, 1 minutu a vzniklý supernatant byl kompletně odstraněn. Pelety byly resuspendovány v 100 µl SOL I (viz. 4.1.3) a každá byla důkladně promíchána. Poté bylo přidáno 200 µl SOL II (viz. 4.1.3), roztok byl promíchán a ponechán stát maximálně 5 minut na ledu, aby nedošlo k denaturaci pDNA. Jako další bylo přidáno 150 µl SOL III (viz. 4.1.3) a vzniklý roztok se sraženinou byl promíchán inverzí tak, aby se nerozpadla. Poté byly mikrozkmavky centrifugovány při 13000 rpm, 4 °C, 15 minut. Mezitím byl připraven stejný počet mikrozkmavek jako vzorků, pipetováno do každé 400 µl isopropanolu a vzorky byly umístěny do ledové tříště. Po dokončení centrifugace bylo z každé z mikrozkmavek pipetováno 400 µl vzorku a přidáno 400 µl isopropanolu. Vzniklé směsi byly promíchány a centrifugovány při 13000 rpm, 4 °C, 10 minut. Supernatanty byly odstraněny, každá mikrozkmavka byla vypláchnuta 1 ml 70% ethanolu pro odstranění zbytků isopropanolu a nechána přesušit na papírové utěrce. Vzniklá peleta byla resuspendována ve 40 µl roztoku TE (pH 8) s pankreatickou RNAsou (c=20 µg/ml) a směs byla nechána inkubovat v 70 °C vodní lázni 30 minut.

4.2.5. Kultivace bakterií v tekutém médiu

Účelem kultivace je zmnožení bakterií prováděné v tekutých nebo tuhých živných půdách. Pevné půdy se skládají ze směsi živin obohacujících agarový gel a tekuté půdy ze směsi živin rozpuštěných ve vodě. Bakteriální růst má několik fází, které mezi sebou můžeme poměrně dobře rozlišit. V klidové fázi se buňky množí pomalu, probíhá v nich enzymová příprava na další fáze cyklu a nastává syntéza RNA. V exponenciální fázi probíhá růst velmi intensivně až do vyčerpání živin. Jeho rychlost je individuální vlastností každého použitého bakteriálního kmene. Ve stacionární fázi se již počet buněk téměř nemění a akumulují se toxické produkty. Poslední fáze je odumírání, kdy počet mrtvých buněk

převyšuje počet buněk živých a může v ní docházet ke sporulaci. Růst bakterií v médiu lze měřit spektrofotometricky.

Pracovní postup: Z Petriho misky s potřebným klonem *E. coli*, bylo „kličkou“ přeneseno několik kolonií do 50 ml média a ponecháno růst při 37 °C 12 hodin. Do připravené baňky s 250 ml MDO média s ampicilinem byla 50krát zředěna připravená kultura. Poté byla baňka umístěna na třepačku ve 37 °C (30 °C) a průběžně byla kontrolována optická densita po 20ti minutách. Vždy byl odebrán 1 ml vzorku kultury a změřen spektrofotometru při $\lambda = 600 \text{ nm}$. Po dosažení optické density 0,6 byla kultura indukována pomocí 1,25 ml IPTG. Po 2,5 hodinách bylo odebráno 100 μl vzorku do mikrozkušavky a centrifugováno při 13000 rpm, 25 °C, 1 minutu. Peleta byla resuspendována ve 100 μl SDS „nanášecího“ pufru (viz. 4.1.3.) a v případě supernatantu byl přidán také SDS „nanášecího“ pufru. Poté byla u vzorků provedena elektroforéza na polyakrylamidovém gelu. Po další hodině byla baňka s narostlou kulturou umístěna na několik minut do ledové tříště spolu s centrifugačními kyvetami, do kterých byl obsah baněk následně přelit. Kyvety byly vyváženy a centrifugovány při 4600 rpm, 4 °C, 20 minut. Supernatant byl uschován pro následnou purifikaci proteinu a peleta byla resuspendována v 20 ml 50 mM Tris pufru pH 8 a kyvety byly ještě jednou promyty 5 ml stejného pufru. Vzniklý roztok byl centrifugován při 5000 rpm, 4 °C, 10 minut. Poté byl supernatant odstraněn a peleta zmražena v -20 °C.

4.2.6. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR je metoda používaná k množení specifických úseků DNA, které jsou na začátku a na konci ohraničeny krátkými DNA oligonukleotidy označovanými jako primer. Tímto způsobem se vytváří až mnohamilionové přesné kopie požadovaného úseku DNA, což umožňuje amplifikovat a analyzovat i velmi malé množství DNA. V prvním kroku probíhá denaturace, kdy při 98 °C dochází k rozrušení vodíkových můstků v molekule DNA a jejímu rozpletení. Ve druhém kroku se volí teplota, která je vhodná pro daný primer. Pohybuje se kolem 50-65 °C a dochází k „nasedání“ primeru na jednovláknovou DNA. Poté následuje syntetická část, kdy dochází k samotné syntéze komplementární DNA od 5'ke 3'konci s teplotami mezi 70-80 °C v závislosti na druhu použité polymerázy. Celý proces probíhá většinou ve 30ti až 40ti cyklech, po ukončení elongace se teplota sníží na 4 °C a vzorek je

poté použitelný pro další analýzu, v našem případě pro separaci elektroforézou na agarosovém gelu.

Pracovní postup: Podle tabulky 4.1. byly složky reakce pipetovány do PCR-mikrozkumavky a umístěny do "termocykleru".Přístroj byl poté spuštěn s nastavenými programy dle Tab. 4.2 . Syntetické primery byly navrženy tak, aby všechny „nasedaly“ při teplotě 62 °C.

Tab. 4.1.: Objemy všech složek pro přípravu vzorku pro amplifikační reakci PCR pro 50 µl.

Pipetovací schéma pro PCR	
Komponenty	V (µl)
H ₂ O	27,5
5x Phusion HF Pufr	10,0
10 mM dNTPs	1,0
primer A	2,5
primer B	2,5
vzorová(templátová) DNA	1,0
glycerol	5,0
Phusion DNA polymeráza	0,5

Tab.4.2.: Trvání a teploty jednotlivých cyklů při PCR.

Schéma cyklu PCR		
	T (°C)	t (s)
1.	98	10
2.	62	30
3.	72	15-30/kb
Opakování kroku 1-3 30-40krát		

Seznam primerů použitý v této práci je uveden na další straně.

Forward FhaBprimer

5'- TTT ACTAGT ATGAACACGAACCTGTACAGG - 3'

Reverse FhaBprimer

5'- TTT ACTAGT TCCGCCGCGCACGTCGAT - 3'

Forward FhaCprimer

5'- TTT CATATG ACTGACGCAACGAACCG - 3'

Reverse FhaCprimer

5'- TTT CATATG TCAGAAACTGAGGCCGCCC - 3'

Forward T7/Lac promotorprimer

5'- TTT CTTAAG TGGCACGACAGGTTTCCC - 3'

Reverse T7/Lac promotorprimer

5'- AAA ATGCAT ATTTATATCTCCTTCTTAAAGTTA- 3'

4.2.7. Příprava agarosového gelu

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, agarosa je lineární polysacharid tvořený z D-galaktosy a 3,6-anhydro-L-galaktopyranosy. Agarosa není toxická, snadno se připravuje a gely z ní vyrobené jsou stálé, dobře se uchovávají. Mezi výhody patří poměrně velké rozmezí velikosti molekul DNA, jež je možno na agarose dělit.

Pracovní postup: Pro přípravu 400 ml agarosového gelu bylo „odváženo“ potřebné množství agarosy odvíjející se od požadované hustoty připravovaného gelu (Tab. 4.3). Stanovené množství agarosy bylo převedeno do nádoby pro gel a bylo přilito 200 ml TBE. Tato směs byla rozehráta v mikrovlnné troubě do rozpuštění agarosy. Poté bylo přidáno dalších 200 ml TBE, promícháno a přidáno 14 μ l ethidium bromidu, což je fluorescenční barvivo velmi specificky se vážající na nukleové kyseliny. Agarosa v tekutém stavu byla poté nalita do formy a ponechána ztuhnout.

Tab. 4.3.: Množství agarosy pro přípravu 0,6 a 2% agarosového gelu.

Příprava agarosového gelu		
ω_{agarosy} (%)	m_{agarosy} (g)	V_{gelu} (ml)
0,6	2,4	400
2	8	400

4.2.8. Příprava polyakrylamidového gelu

Akrylamid patří mezi potencionální karcinogeny a mutageny, a je tak zařazen na seznam nebezpečných látek. Práce s ním se tak vždy musí provádět v rukavicích a s velkou opatrností. Do speciální aparatury se tak nejdříve nanáší gel separační a po jeho ztuhnutí gel zaostřovací s hřebínkem. Mezi jeho výhody patří velké množství vzorku, který může pojmout a velmi vysoká rozlišovací schopnost.

Pracovní postup: Pro přípravu polyakrylamidového gelu byly zkumavce smíchány všechny složky separačního gelu (Tab. 4.4), kdy jako poslední byl přidán TEMED a roztok byl rychle „nanesen“ do aparatury. Poté byla přidána vrstva ethanolu pro zajištění rovnoměrného horizontálního rozpoložení hladiny. V další zkumavce byly připraveny složky „zaostřovacího“ gelu (Tab. 4.4) a opět byl jako poslední přidán TEMED. Ethanol byl odlit, gel byl převrstven roztokem „zaostřovacího gelu“ a do něj byl umístěn hřebínek. Po zatuhnutí byl hřebínek odstraněn a gel byl připraven k použití.

Tab. 4.4.: Objemy všech složek pro přípravu 10% polyakrylamidového gelu.

Příprava 10 % polyakrylamidového gelu		
Komponenty	Separací gel	Zaostřovací gel
Akrylamid 30%	1,66 ml	266 µl
destilovaná H ₂ O	1,38 ml	1,23 ml
Tris 1M pH 8.8	1,87 ml	-
Tris 1M pH 6.8	-	200 µl
SDS 10%	50 µl	60 µl
APS 25%	12,5 µl	20 µl
TEMED	12,5 µl	5 µl

4.2.9. Elektroforéza na agarósovém gelu

Elektroforéza patří mezi separační metody a využívá se k oddělení látek na základě jejich různé pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli.

Pracovní postup: Rozehřátý gel byl přelit do formy a přidán hřebínek pro vytvoření otvorů pro vzorky. Tato elektroforéza probíhá v horizontální poloze. K DNA se přidá malé množství

tmavě zbarveného nanášecího pufru, který zajistí klesnutí DNA na dno jamek a lze díky němu kontrolovat pohyb vzorku v gelu. Většinou se do první z jamek dává proteinový standard, což je směs DNA o známých molekulových hmotnostech, jež usnadňuje identifikaci velikosti určitých fragmentů. Po elektroforéze v přítomnosti TBE pufru probíhá vyhodnocení v UV transluminátoru. Ten zviditelňuje EtBr vmezeřený mezi řetězce DNA a je tak možná poměrně přesná analýza vzorku nebo jeho vyříznutí a následné zpracování potřebného fragmentu.

4.2.10. Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu probíhá ve vertikální poloze. Ke vzorku proteinů, které chceme na gelu separovat, se přidává β -merkapt ethanol pro rozrušení disulfidických vazeb a SDS. Dodecylsírán sodný je denaturační činidlo a detergent, který proteiny obaluje a uděluje jim uniformní záporný náboj. Zajišťuje tak závislost pohyblivosti pouze na molekulové hmotnosti polypeptidových řetězců. Po elektroforéze se gel obarvuje v bromfenolové modři nebo se využívá pro “Western blot”.

Pracovní postup: Pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu byl připravený 10% gel, sestaven do aparatury a ta byla naplněna Tris-glycinovým pufrem. Do mikrozkupek se vzorkem byl přidán nanášecí pufr. Směs vzorků a činidel byla navrstvena pomocí Hamiltonovy stříkačky do připravených otvorů po hřebínku a do prvního z nich byl přidán proteinový standard. Poté byly zapojeny elektrody a byla provedena elektroforéza při 50 mA. Aparaturu byla poté rozebrána a gel použit pro přenos proteinu na membránu nebo vložen do vaničky s bromfenolovou modří a ponechán 1 hodinu na třepačce při pokojové teplotě. Poté byla bromfenolová modř odstraněna a gel byl přes noc promýván v odbarvovacím pufru. Tímto způsobem byly na gelu modře zvýrazněny všechny proteiny.

4.2.11. Izolace fragmentů DNA z gelu

Po elektroforéze na agarosovém gelu a následném vyříznutí fragmentu DNA pod UV transluminátorem bylo pokračováno izolací DNA. Podstatou je inkubace proužku agarosového gelu s vazebným pufrem v mikrozkupece při 50°C, kde se gel s DNA

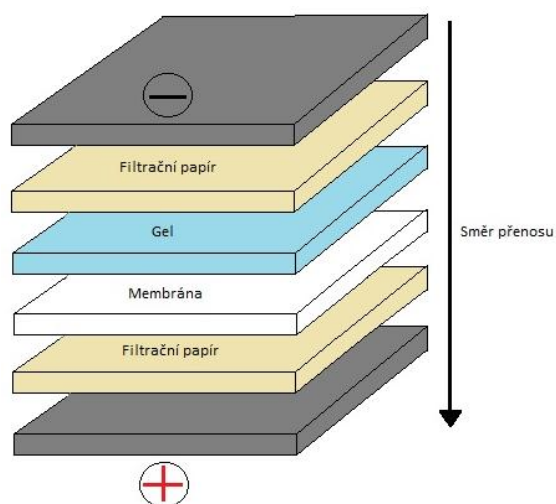
rozpustí. Roztok se poté přenesse do 2 ml zkumavky s kolonkou a centrifuguje. DNA se „naváže“ na kolonku, promyje se a poté se vymyje pomocí elučního pufru.

Pracovní postup: K fragmentu DNA v mikrozkuhavce bylo přidáno trojnásobné množství vazebného pufru a ponecháno při 50 °C za občasného promíchání 20 minut. Do 2ml zkumavky byla „nasazena“ kolonka, která je součástí kitu (NZYtech, Lisabon) a bylo na ní napipetováno 700 µl roztok vazebného pufru s DNA. Zkumavka byla centrifugována při 13000 rpm, 25 °C, 1 minutu a supernatant, který přešel do 2ml zkumavky, byl odstraněn. Pokud bylo vzorku více, poslední krok byl opakován. Poté bylo na kolonku pipetováno 700 µl promývacího pufru a ta byla centrifugována při 13000 rpm, 25 °C, 1 minutu. Supernatant byl odstraněn a kolonka přesunuta do čisté mikrozkuhavky. Na její střed bylo pipetováno 40 µl elučního pufru. Po 2 minutové inkubaci při pokojové teplotě byla kolonka opět centrifugována při 13000 rpm, 25 °C, 1 minutu. Supernatant, ve kterém byla potřebná DNA, byl zmražen při -20 °C.

4.2.12. Specifická imunodetekce proteinu na membráně (“Western blot”)

“Western blot” je analytická metoda, která se využívá k detekci určitého proteinu ze směsi proteinů. Obvykle následuje po elektroforéze v polyakrylamidovém gelu, kdy se proteiny z gelu přenášejí na nitrocelulosovou membránu. Proteiny „obalené“ SDS se přenášejí vlivem elektrického pole z gelu na membránu. Poté se membrána přenesse do nádoby nebo fólie a inkubuje se 1 hodinu s roztokem PBST s BSA, který blokuje nespecifická vazebná místa. Poté se přidá primární protilátka, membrána se s ní inkubuje 1 hodinu a promyje se roztokem PBST. Následuje přidání a hodinová inkubace se sekundární protilátkou, která je konjugována s křenovou peroxidázou. Ta katalyzuje v přítomnosti H_2O_2 oxidaci luminolu, který při stabilizaci vyzařuje světlo zachycované pomocí detekčního přístroje. Všechny inkubace jsou prováděny při laboratorní teplotě.

Pracovní postup: Nejdříve byla připravena nitrocelulósová membrána a 2 filtrační papíry o velikosti námi připraveného 10 % polyakrylamidového gelu. Filtrační papíry a membrána byly ponořeny do „blotovacího“ pufru a spolu s gelem byly umístěny do přenosového zařízení podle Obr. 4.1. Přístroj byl uzavřen horním dílem, připojen ke zdroji na 1 hodinu při napětí 50 mA .



Obr. 4.1.: Schematický náčrt zařízení pro Western blot

Po ukončení elektroforetického přenosu byla membrána inkubována v roztoku PBST-BSA (viz. 4.1.3). Roztok byl poté odstraněn a přidán roztok PBST-BSA (viz. 4.1.3) s vhodně ředěnou primární myší monoklonální anti-FHA-protilátkou. Membrána s tímto roztokem byla následně ponechána na třepačce při laboratorní teplotě 1 hodinu. Poté byla 3krát promyta pomocí PBST (viz. 4.1.3) vždy po 10ti minutách. K membráně byl následně přidán roztok PBST-BSA (viz. 4.1.3) s vhodně ředěnou sekundární protilátkou. Membrána se následně třepala při laboratorní teplotě 1 hodinu. Roztok se sekundární protilátkou byl odstraněn a membrána byla 3krát pomyta pomocí PBST vždy po 10ti minutách. Takto připravená membrána byla osušena, převrstvena 2 ml luminiscenčního roztoku, získaného smíšením 1 ml roztoku A a 1 ml roztoku B (viz. 4.1.3), a analyzována pomocí přístroje LAS4000.

4.2.13. Štěpení dsDNA

Restrikční endonukleázy jsou schopny štěpit dsDNA na specifických palindromatických sekvencích. Vznikají tak podle druhu enzymu „tupé“ nebo kohezní konce štěpených fragmentů, které je poté možno zpět seskupovat s jinou dsDNA štěpenou stejným enzymem.

Pracovní postup : Do mikrozkušavky byla pipetována reakční směs viz.Tab 4.5. a reakce probíhala ve vodní lázni o teplotě 37 °C po dobu 2-4 hodin v závislosti na použitém

enzymu a koncentraci DNA. Obecně je upřednostňován 1 µl enzymu na 20 µl reakční směsi. BSA se do reakce přidává jen pokud to vyžaduje použitý enzym.

Tab. 4.5.: Objemy všech složek reakční směsi pro štěpení dsDNA

Štěpení vektoru	
Komponenty	V (µl)
vektor	25
NE Pufr 10x(1,2,3,4)	3
BSA 100x	0,3
Restrikční endonukleáza	1,5

4.2.14. Ligace dsDNA

Ligace spojuje 2 fragmenty dsDNA. Tato reakce se provádí enzymem T4 DNA Ligázou, který je schopen spojit fosfát na 5' konci jedné DNA s OH skupinou na 3' druhé. Reakce využívá ATP v reakčním pufru.

Pracovní postup : Do mikrozkušavky byla pipetována reakční směs viz 4.6., a reakce probíhala při laboratorní teplotě 24 hodin.

Tab. 4.6.: Objemy všech složek reakční směsi pro ligaci dsDNA

Ligace vektoru	
Komponenty	V (µl)
vektor	1
Insert	16
Pufr T4 DNA Ligázy	2
T4 DNA Ligáza	1

4.2.15. Komplementace dsDNA ze dvou ssDNA

Dvě jednovláknové DNA se denaturují za vysoké teploty (98 °C) a při chladnutí dochází ke komplementaci bazí.

Pracovní postup : FHA adaptor byl komplementován ze 2 syntetických oligonukleotidů (92 a 94mer), jejichž sekvence je uvedena níže. 20 µl od každého bylo

pipetováno do mikrozkušavky, umístěno na plováček do kádinky s vařící vodou. Po vychladnutí na laboratorní teplotu byl adaptor připraven.

Forward-FHAadaptor:

5' - TATGCTTAAGAAAATGCATAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGG
TTTCGCTACCGTAGCGCAGGCCACTAGTAAGCTTG - 3'

Reverse-FHAadaptor:

5' - AATTCAAGCTTACTAGTGGCCTGCGCTACGGTAGCGAAACCAGCCAGTGCCACTGCAA
TCGCGATAGCTGTCTTTTATGCATTTTCTTAAGCA - 3'

4.2.16. Expres rekombinantního proteinu

Pro expresi rekombinantních proteinů se velmi často používají prokaryotní systémy.

Ačkoliv neumožňují posttranslační modifikace, patří mezi nejlevnější a nejrychlejší.

Exprimovaný protein je pomocí purifikačního systému oddělen od nežádoucích nečistot a následně využit pro další analýzu.

Pracovní postup: Expresní vektor byl transformován do buněk *E. coli*, která „rostla“ na agarové misce 24 hodin při 37 °C. Poté bylo několik kolonií přeneseno „kličkou“ do 2 baněk s 50 ml MDO média a ponecháno třepat 12 hodin ve 37 °C. „Noční kultura“ byla poté ředěna 60krát do čistého LB média s ampicilinem (c = 150 µg/ml). Pravidelně každých 30 minut byla měřena optická densita média a po dosažení hodnoty 0,6 byla kultura indukována pomocí IPTG na celkovou koncentraci 1 mM a ponechána na třepačce ve 30 °C 16 hodin. Kultura byla po skončení kultivace centrifugována při 4600 rpm, 4 °C, 30 minut. Supernatant byl přefiltrován přes 0,2 µm filtr.

4.2.17. Purifikace rekombinantního proteinu

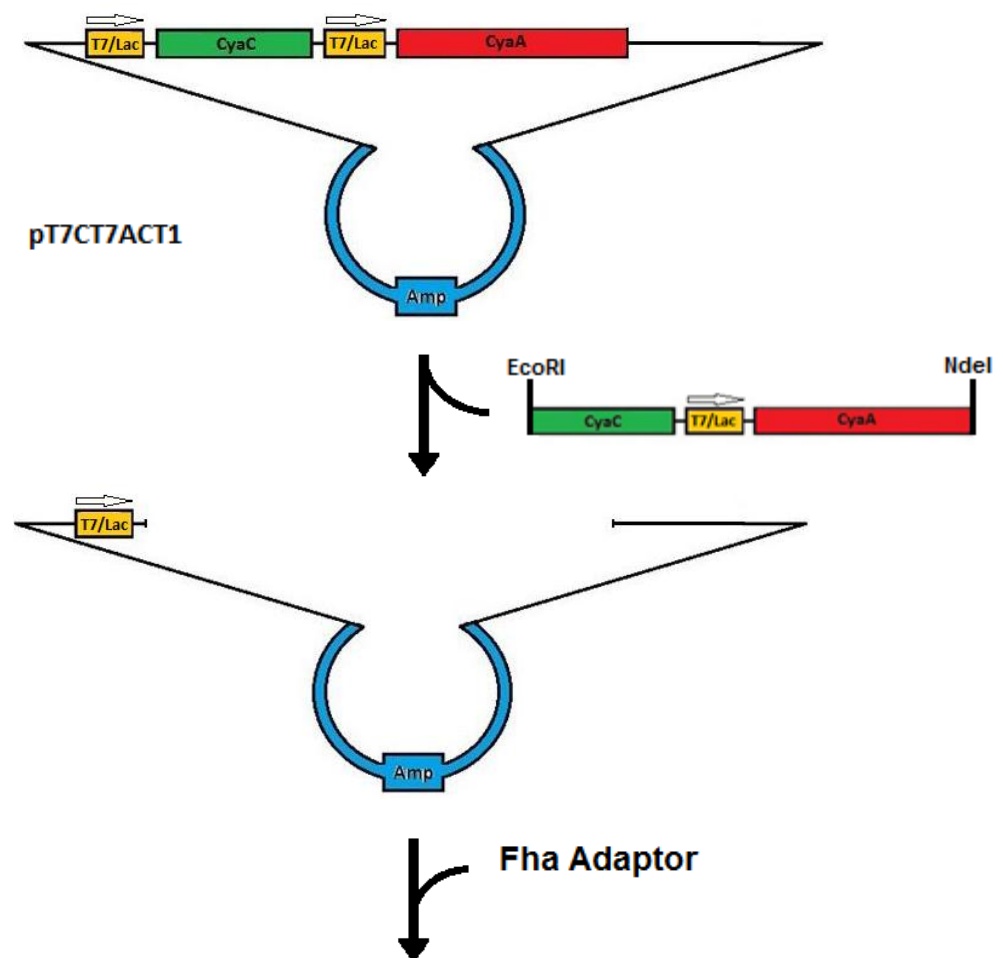
Exprimovaný protein je pomocí afinitní kapalinové chromatografie oddělen od nežádoucích nečistot a následně využit pro další analýzu. Jako nosič pro afinitní chromatografii byl použit Cellufine sulfát (JNC corporation, Japonsko), který má afinitu k heparin-vazebné doméně obsažené v FHA.

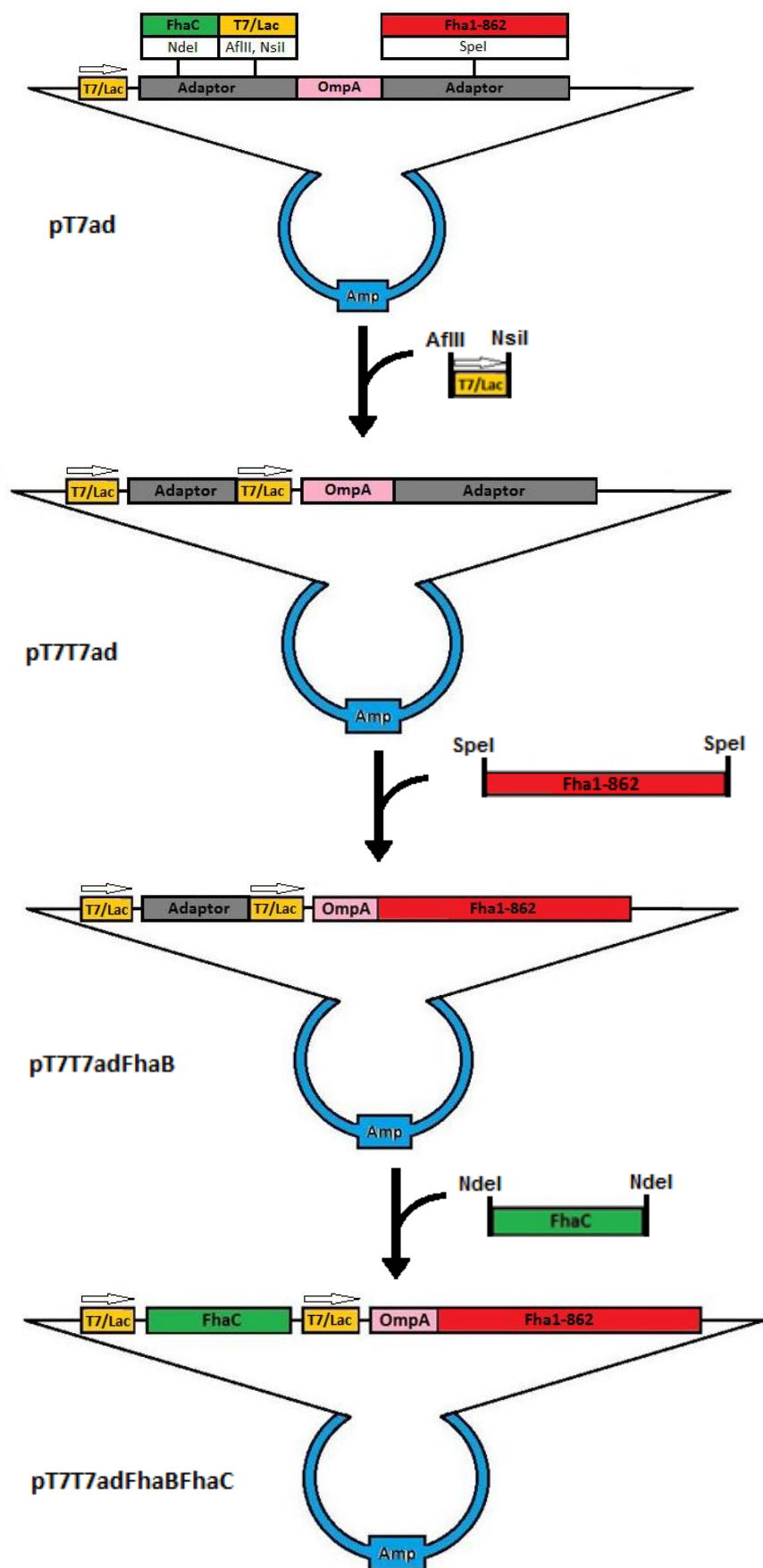
Pracovní postup: Na každou ze 2 kolon s fritou byl pipetován 1 ml nosiče. Ten byl nejdříve promyt pomocí 0,01 M fosfátového pufru pH 7,6 pro odstranění zbytkového ethanolu, ve kterém byl nosič skladován. Po upravení pH kultury na 7,6 byla přelita na připravené kolony a nechána projít přes nosič. Cellufine byl poté promyt pomocí 0,01 M fosfátového pufru pH 7,6 a protein eluován po 1 ml frakcích pomocí 0,01 M fosfátového pufru s 1 M NaCl. Protein byl následně analyzován pomocí SDS-PAGE a “Western blotu” a skladován při -80 °C.

5.1. Výsledky

Vektor pro heterologní expresi FHA1-862 v *E. coli* byl složen ze systému 2 nezávislých T7/Lac promotorů. Za první promotor byl vložen gen kódující membránový protein FhaC o velikosti 1752 párů bazí. Za druhý promotor bylo vloženo prvních 2586 párů bazí z genu FhaB kódujícího aminokyselinovou sekvenci filamentózního hemaglutininu 1-862 (FHA1-862). Pro umožnění průchodu FHA1-862 do periplasmy byla dále přidána signální sekvence proteinu OmpA. Na Obr. 5.1., jsou schematicky znázorněny jednotlivé kroky při klonování vektoru.

5.1. Příprava plasmidu pT7T7adFhaBFhaC

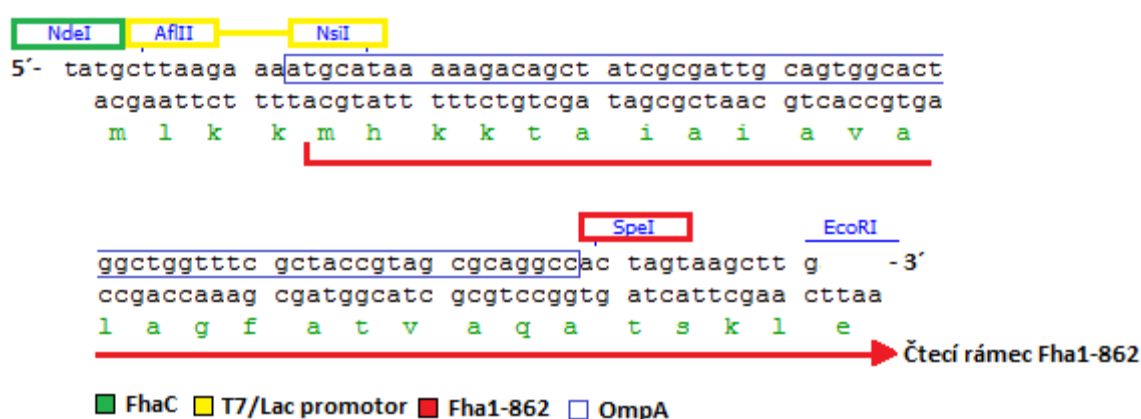




Obr. 5.1.: Schematický náčrt postupného klonování plasmidu pT7T7adFhaBFhaC. Amp – gen kódující resistenci na ampicilin

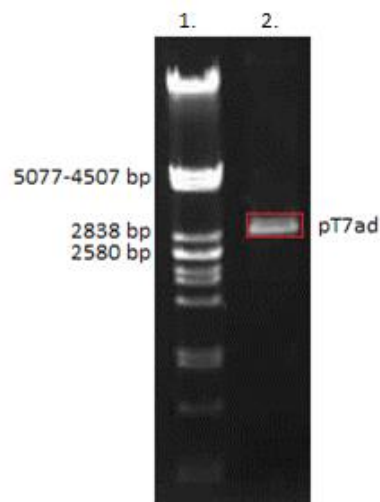
Nejdříve byla provedena transformace *E. coli* XL1 plasmidem pT7CT7ACT1. Z agarové misky byla poté izolována pDNA, která byla následně štěpena restrikčními endonukleázami (EcoRI, NdeI). Po elektroforéze byla část agarosového gelu s fragmentem o velikosti 2866 párů bazí vyříznuta a DNA izolována pomocí „kitu“. (viz. 4.2.11.).

Následně byl zkomplementován syntetický oligonukleotid Fha Adaptor. Ten byl navržen tak (Obr. 5.2), aby mohl být přímo ligován s fragmentem plasmidu pT7CT7ACT1 (EcoRI, NdeI). Poté byla provedena ligace fragmentu plasmidu s FHA Adaptorem. Nukleotidová sekvence genu kódující signální peptid OmpA byla součástí FHA adaptoru (Obr. 5.2.).



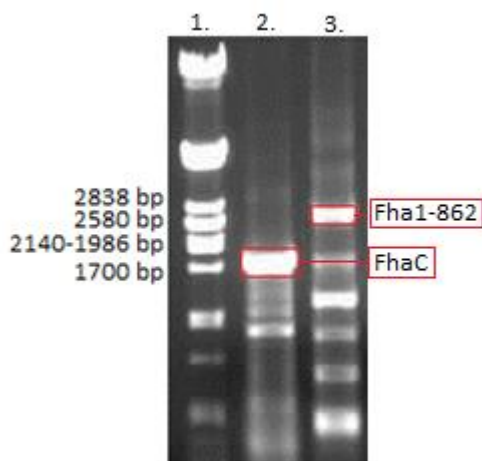
Obr.5.2.: Schéma FHA Adaptoru. Čtecí rámec a restrikční místa jsou zvýrazněna.

Ligační směs byla další den transformována do *E. coli* XL1. Jednotlivé klony z agarové misky byly přesunuty do 2 ml LB média s ampicilinem a byla provedena minipreparace DNA. Přítomnost FHA Adaptoru byla ověřena restrikční analýzou. Štěpení v unikátním restrikčním místě v Adaptoru (NdeI) linearizovalo plasmid a potvrdilo vložení oligonukleotidu (Obr. 5.3.). Plasmid byl následně charakterizován sekvenací a použit pro další experimenty.



Obr. 5.3.: Elektroforéza na agarosovém gelu ilustrující restrikční analýzu fragmentu plasmidu pT7ad enzymem NdeI. V 1. dráze je standard, červeně je označen lineární fragment plasmidu pT7ad

Následně byla provedena PCR amplifikace genů kódujících T7/Lac promotor, FhaC a FHA1-862 pomocí primerů uvedených v kapitole 4.2.6.. Jako templátová DNA pro T7/Lac promotor byl použit plasmid pT7CT7ACT1. Pro FhaC a FHA1-862 byla jako templát použita chromosomální DNA z *B. pertussis* Tohama I. Fragmenty z gelu s požadovaným DNA vyznačené na Obr. 5.4. byly vyříznuty a izolována DNA.



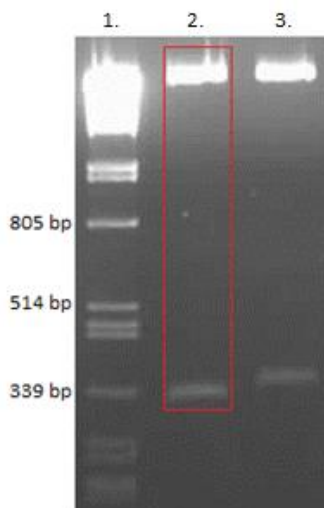
Obr. 5.4.: Elektroforéza na agarosovém gelu ilustrující PCR amplifikaci genů kódujících membránový protein FhaC a protein FHA1-862. V 1. dráze standard, ve 2.dráze PCR-produkt FhaC, ve 3. PCR-produkt FHA1-862.

PCR-produkty byly štěpeny restričními endonukleázami dle Tab. 5.1.

Tab. 5.1.: Štěpení PCR-produktů pomocí restričních endonukleáz

Štěpení PCR	
PCR-produkt	Enzym
T7/Lac promotor	AflII, NsiI
FhaC	NdeI
FHA1-862	SpeI

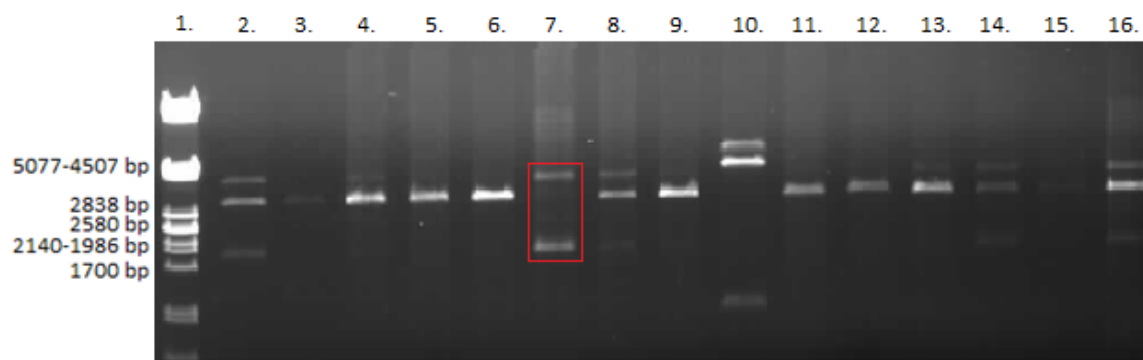
Plasmid pT7ad byl štěpen restričními enzymy (AflII, NsiI). Po elektroforéze byla část agarosového gelu s fragmentem plasmidu o velikosti 2942 párů bazí vyříznuta a izolována DNA. Poté byla DNA ligována s PCR-produktem T7/Lac promotor. Po minipreparaci DNA následovala restriční analýza pomocí endonukleáz (AflII, NsiI). Při analýze byly objeveny klony o různých velikostech z důvodu použití pT7CT7ACT1 jako templátu. Ten obsahoval 2 T7/Lac promotory o různých velikostech (Obr. 5.5.). Pro další práci byl zvolen plasmid pT7T7ad s promotorem o velikosti 267 párů bazí a charakterizován sekvenací.



Obr.5.5.: Elektroforéza na agarosovém gelu ilustrující restriční analýzu ligace plasmidu pT7T7ad a T7/Lac promotoru enzymy AflII, NsiI. V 1. dráze je standard, pozitivní klon je vyznačen červeně (č.2).

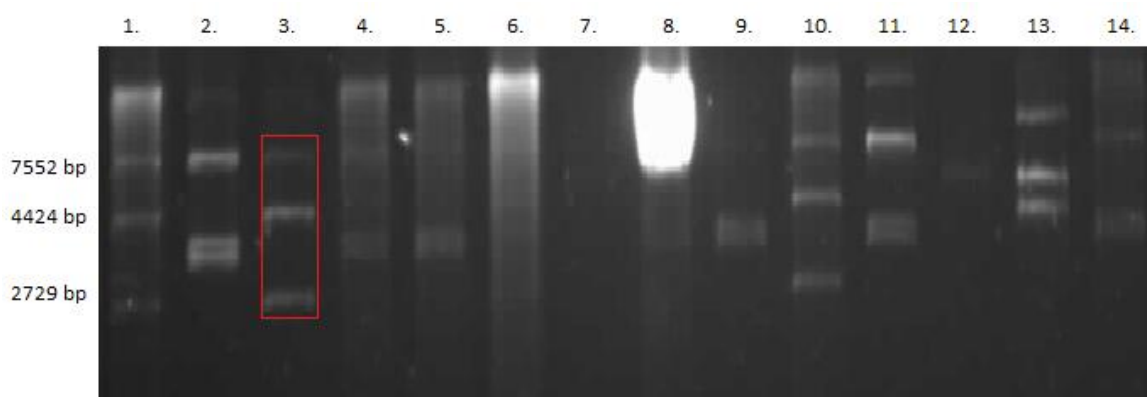
Plasmid pT7T7ad byl štěpen pomocí restriční endonukleázy (SpeI). Lineární fragment o velikosti 3202 párů bazí byl vyříznut z gelu a byla izolována DNA. Fragment byl ligován s identicky štěpeným PCR-produktem FHA1-862 (SpeI). Po minipreparaci byla DNA

štěpena restričními enzymy (NdeI, EcorV) pro ověření vložení PCR-produktu FHA1-862. Štěpení správně vloženého genu vytvořilo 2 fragmenty o velikostech 2108 párů bazí a 3686 párů bazí. Klon č. 6 (Obr. 5.6.) byl charakterizován sekvenací a použit pro další experimenty.



Obr.5.6.: Elektroforéza na agarosovém gelu ilustrující restriční analýzu po ligaci plasmidu pT7T7ad s PCR-produktem FhaB enzymy NdeI, EcorV. V 1. dráze je standard, červeně je vyznačen pozitivní klon (č.6).

Plasmid pT7T7adFhaB byl štěpen restriční endonukleázou (NdeI). Lineární fragment o velikosti 5790 bps byl vyříznut z gelu a izolována DNA. Tento fragment byl ligován s identicky štěpeným PCR-produktem FhaC (NdeI). Po minipreparaci DNA bylo provedeno restričním štěpení (EcoRI, DraIII) pro ověření vložení PCR-produktu FhaC. Štěpení správně vloženého genu tvořilo fragmenty o velikosti 4424 párů bazí a 2729 párů bazí.

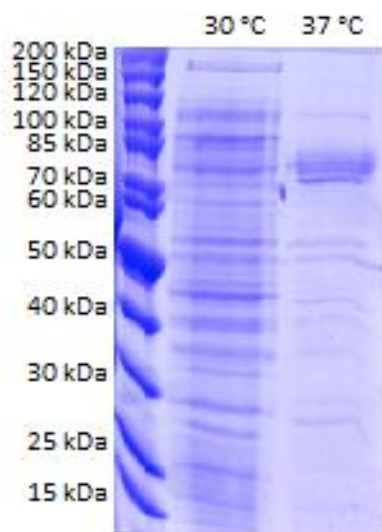


Obr. 5.7.: Elektroforéza na agarosovém gelu ilustrující restriční analýzu po ligaci plasmidu pT7T7adFhaB s PCR-produktem FhaC pomocí enzymů EcoRI a DraIII. Červeně je vyznačen pozitivní klon (č.3).

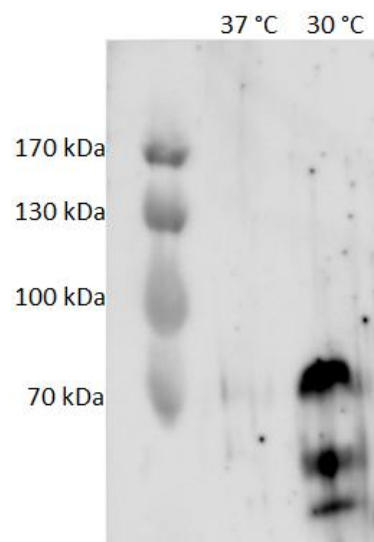
Klon č. 3 plasmidu pT7T7adFhaBFhaC byl charakterizován sekvenací a následně použit pro expresi FHA1-862 v buňkách *E. coli*.

5.2. Exprese a purifikace FHA1-862 v buňkách *E. coli*

Plasmid pT7T7adFhaBFhaC byl transformován do buněk *E. coli* BL21λ(DEA3), nicméně nebyly získány žádné kolonie. Tato transformace byla pro buňky toxická a pro další práci byly proto použity buňky *E. coli* BL21 pMM100 nesoucí plasmid s genem LacI^q (Lac represor) a resistencí vůči tetracyklinu. Následně byla ověřena sekrece proteinu FHA1-862 v 50 ml bakteriální kultuře. Analýza vzorků supernatantu z kultur rostoucích při 30 a 37 °C byla provedena pomocí SDS-PAGE. Na Obr. 5.8 je vidět rozdíl v proteinovém zastoupení v supernatantech bakterií pěstovaných ve 30 a 37 °C. Několik proteinových pruhů ve výšce 80 kDa naznačovalo přítomnost FHA1-862. Pro identifikaci sekretovaného FHA1-862 byla použita metoda specifické imunodetekce na membráně pomocí anti-FHA-monoklonální protilátky. Jak je patrné z Obr. 5.9., str.51, anti-FHA-protilátka v supernatantu bakteriální kultury specificky rozpoznala protein o velikosti přibližně 80 kDa, což odpovídá předpokládané velikosti proteinu FHA1-862. Zároveň byly detekovány proteinové proužky s nižší molekulovou hmotností, odpovídající degradačním produktům FHA1-862. Nicméně, jak je dále znázorněno na Obr. 5.9., str. 51, protein FHA1-862 byl sekretován pouze z buněk rostoucích při 30 °C, zatímco supernatant buněk rostoucích při 37 °C neobsahoval žádný sekretovaný FHA1-862.



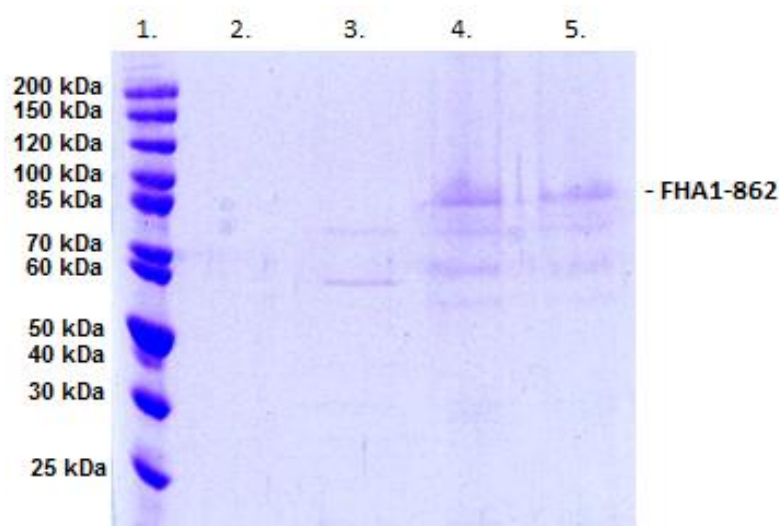
Obr. 5.8.: Analýza proteinového složení v supernatantu kultury *E. coli* exprimující FHA1-862 ve 30 a 37 °C pomocí SDS-PAGE a barvení v Coomassie Blue. V 1. dráze je standard, ve 2. supernatant z bakteriální kultury kultivované při 30 °C, ve 3. supernatant z bakteriální kultury kultivované ve 37 °C



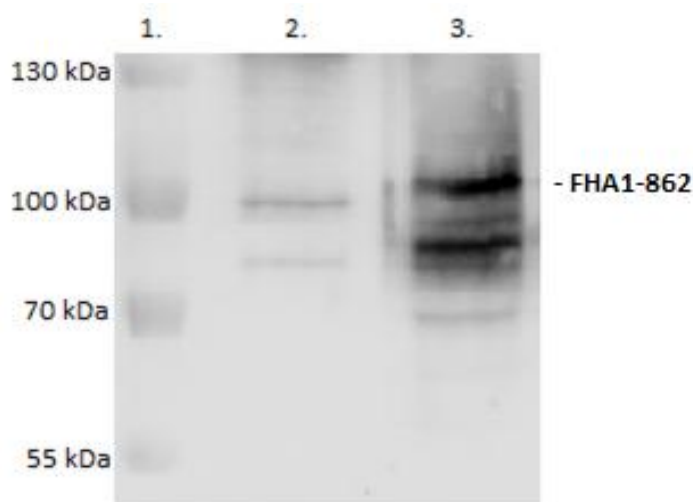
Obr 5.9.: Imunochemická detekce proteinu FHA1-862 v supernatantu kultury *E. coli* pěstované ve 30 či 37 °C. V 1. dráze je standard, ve 2. supernatant z bakteriální kultury kultivované při 37 °C, ve 3. supernatant z bakteriální kultury pěstované ve 30 °C

Následně po optimalizaci podmínek exprese byla provedena velkoobjemová kultivace v 6 l média a purifikace proteinu z bakteriálního supernatantu pomocí afinitní kapalinové chromatografie na nosiči Cellufine. Chromatografická kolona s 2 ml Cellufinu byla ekvilibrována pomocí 10 mM fosfátového pufru pH 7,6 a pomalu promyta 6 l přefiltrovaného supernatantu obsahující protein FHA1-862. Kolona byla poté promyta 10 mM fosfátovým puforem pH 7,6 a navázaný protein byl z kolony eluován po 1-ml frakcích pomocí 10 mM fosfátového pufru pH 7,6 obsahující 1 M NaCl. Přítomnost proteinu v jednotlivých frakcích byla kontrolována pomocí činidla Bradfordové. Jednotlivé frakce byly dále analyzovány na 10% polyakrylamidovém gelu pomocí SDS-PAGE. Jak je patrné z Obr. 5.10., str. 52 4. a 5. dráha obsahovala několik proteinových proužků. K identifikaci těchto pruhů byla dále použita metoda specifické imunodetekce pomocí anti-FHA-monoklonální protilátky. Jak je patrné z Obr. 5.11, str. 52 anti-FHA-protilátka v purifikátu rozpoznala protein o velikosti přibližně 100 kDa, což odpovídá sekretovanému proteinu FHA1-862 (zde je nutno poznamenat, že proteinové standardy používané pro „Western

blotting“ a pro standartní SDS-PAGE byly odlišné) a protein o velikosti přibližně 80 kDa odpovídající degradačnímu produktu FHA1-862. Jako pozitivní kontrola posloužil purifikovaný protein FHA862 sekretovaný geneticky upraveným kmenem bakterie *B. pertussis*. Jak je vidět na Obr. 5.11., oba proteiny FHA1-862 sekretované jak *B. pertussis* tak i v *E. coli* mají stejnou molekulovou hmotnost a dokonce i velikost degradačního produktu je velmi podobná. Celkový výtěžek proteinu FHA1-862 ze 6 l média se pohyboval kolem 0,5 mg proteinu.



Obr.5.10.: 10 % polyakrylamidový gel se vzorky z afinitní purifikace proteinu FHA1-862 ze supernatantu *E. coli* na nosiči Cellufine analyzovaný pomocí SDS-PAGE a barvení v Coomassie Blue. V 1. dráze je standard, ve 2.-5 dráze jsou jednotlivé frakce z kolony



Obr.5.11.: Imunochemická detekce proteinu FHA1-862 po afinitní purifikaci na nosiči Cellufine. V 1. dráze je standard, ve 2. dráze protein FHA1-862 purifikovaný z geneticky upraveného kmene *B. pertussis* a ve 3. dráze protein FHA1-862 purifikovaný ze supernatantu *E. coli*.

6. Diskuze

Pro heterologní expresi partnerských proteinů se běžně používá několik metod. Pro eukaryotické systémy je vhodný „bicistronický“ (z angl. Bicistronic) vektor, který využívá specifické nukleotidové sekvence IRES (z angl. Internal ribosome entry site). Tato sekvence umožňuje translaci z prostředku mRNA. Při použití jednoho promotoru tak dochází k translaci dvou „čtecích“ rámců v rámci jedné molekuly mRNA. V praxi bylo ale ukázáno velké snížení exprese druhého genu [39]. V prokaryotických buňkách se používají 2 vektory pro simultánní expresi 2 genů, což částečně řeší problém se snížením exprese druhého genu. Jeden z vektorů se ale často stává dominantním v počtu kopií i při použití kompatibilních počátků replikace [40]. Exprese partnerských proteinů nemusí probíhat ve správném poměru. V konstrukci plasmidu pT7T7adFhaBFhaC byli záměrně použity dva T7/Lac promotory pro každý z přepisovaných genů. Nezávislá transkripce obou genů vede k rovnoměrné expresi proteinů a snížení rizika degradace mRNA. Bakterie k podobnému účelu používají systémy polysomů. Na jednu mRNA „nasedá“ větší množství ribosomů, které simultánně syntetizují požadovaný protein.

Transformace plasmidu pT7T7adFhaBFhaC do kompetentních buněk *E. coli* BL21 DE3 se ukázala jako neúspěšná z důvodu bazální exprese T7 polymerázy a následného přepisu genu FhaC či FhaB (popř. obou dohromady), což bylo pro buňky toxické. Tento problém se dá řešit několika způsoby. Kromě systémů indukovatelných pomocí IPTG se také používá systém indukovaný arabinosou. Ten ale dosahuje nízkých výtěžků exprimovaných proteinů. Dalším způsobem je represe T7 polymerázy pomocí T7 lysozymu. Jelikož je ale sám T7 lysozym ve vyšších koncentracích pro buňky toxický, nelze s tímto systémem také dosáhnout optimální produkce. U toxických proteinů je třeba dosáhnout velmi vysokého stupně represe T7 RNA polymerázy. Proto byly použity kompetentní buňky *E. coli* BL21 pMM100, jež nesou represorový gen *lacI*^q. Represor inhibuje produkci T7 RNA polymerázy a je uvolněn z DNA operátorového místa až po přidání IPTG.

Jak je patrné z Obr. 5.10., str. 52 v purifikovaném proteinovém vzorku bylo detekováno větší množství proteinových pruhů. Pro případ, že se jedná o odlišné protein byla přítomnost FHA1-862 prokázána pomocí imunodetekce na membráně s primární anti-FHA- monoklonální protilátkou rozpoznávající N-koncovou část FHA. Při pohledu na

Obr. 5.11., str. 52 můžeme konstatovat, že pruh s nejvyšší molekulovou hmotností odpovídá proteinu FHA1-862, který se pravděpodobně vlivem velkého množství proteáz v supernatantu *E. coli* štěpí na fragmenty o menších velikostech. Tyto části původního proteinu mají však stále detekovatelný epitop. V průběhu a purifikace nebyl použit žádný inhibitor proteáz. FHA prochází proteolytickým štěpením během translokace skrz vnější cytoplasmatickou membránu a přidání inhibitoru by mohlo ovlivnit sekreci proteinu do extracelulárního prostoru.

V nativním prostředí (*B. pertussis*) dochází u FHA k odštěpení signální sekvence Sec systému při translokaci skrz vnitřní cytoplasmatickou membránu. Velikost proteinů sekretovaných v *B. pertussis* a *E. coli* byla prakticky stejná. V *B. pertussis* je samotná sekrece FHA1-862 závislá na neprodlené vazbě na FhaC po průchodu vnitřní membránou a tento proces je tak v *B. pertussis* dobře regulován [32]. Bohužel nebyla k dispozici anti-FhaC-protilátka. Nemohla tak být ověřena efektivnost produkce membránového proteinu FhaC nutného k úspěšné expresi FHA1-862 do extracelulárního prostoru. Důvodem malého množství získaného proteinu může být také tvorba inkluzních tělísek. Tyto nerozpustné útvary v bakteriální cytoplazmě se tvoří ze špatně složených forem exprimovaného rekombinantního proteinu. Jsou snadně oddělitelná od bakteriálního cytosolu a je tak možné je izolovat a následně rozpustit ve vysoké koncentraci močoviny nebo guanidinium chloridu. Jejich izolace by ale neposkytla sekretovanou formu proteinu FHA1-862.

Odlišný systém *E. coli* neposkytuje striktní regulaci systému TPS a ani připojení signálního peptidu OmpA neposkytuje optimální sekreční aparát. Produkce FHA1-862 v *E. coli* je poměrně rychlá a nepatogení v porovnání s *B. pertussis*. Z 6 l kultury bylo ale purifikováno jen okolo 0,5 mg FHA1-862, což je oproti nativnímu prostředí velmi neefektivní.

7. Závěr

V rámci vypracování předkládané bakalářské práce byl vytvořen vektor pro heterologní expresi FHA1-862 v *E. coli*. Plasmid pT7T7adFhaBFhaC byl charakterizován sekvenací a použit pro produkci rekombinantního proteinu FHA1-862. Ten byl sekretován do růstového média *E. coli* a následně z něho purifikován pomocí afinitní kapalinové chromatografie. Čistota a identita proteinu FHA1-862 byla ověřena pomocí polyakrylamidové elektroforézy (SDS-PAGE) a imunochemické detekce proteinu na membráně ("Western blot"). Produkce FHA1-862 v buňkách *E. coli* je proti nativnímu prostředí neefektivní a dochází při ní k částečné degradaci proteinu.

8. Literární zdroje

- [1] U. Heininger , “Update on pertussis in children.,” *Expert Rev Anti Infect Ther.*, vol. 8, no.2, pp. 163–73, 2010.
- [2] P.E. Stein,A. Boodhoo ,G.D. Armstrong ,S.A. Cockle, M.H. Klein “The crystal structure of pertussis toxin,” *Structure.*, vol. 2, no. 1, pp. 45–57., 1994.
- [3] S. R. Z. Christopher D. Paddock, G.N. Sanden, J. D. Cherry, A. A. Gal,“Pathology and Pathogenesis of Fatal Bordetella pertussis Infection in Infants,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 47, no. 3, pp. 328–338., 2007.
- [4] Státní zdravotní ústav,” <http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-2003-2012-absolutne>. (Aktuální ke dni 22.5.2013)
- [5] C.L. Cody,L.J. Baraff,J.D. Cherry,SM. Marcy, “Nature and rates of adverse reactions associated with DTP and DT immunizations in infants and children.,” *Pediatrics.*, vol. 68, no. 5, pp. 650–60, 1981.
- [6] S.S. Patel, “A cellular pertussis vaccine (Infanrix-DTPa; SB-3). A review of its immunogenicity, protective efficacy and tolerability in the prevention of Bordetella pertussis infection.,” *Drugs.*, vol. 52, no. 2, pp. 254–75, 1996.
- [7] G.M. Lee, Ch. LeBaron,T.V. Murphy, “ Pertussis in Adolescents and Adults: Should We Vaccinate,” *Pediatrics.*, vol. 115, no. 6, pp. 1675-1684, 2005
- [8] F.G.A. Versteegh, J.F.P. Schellekens, A. Fleer, J.J. Roord, “Pertussis: a concise historical review including diagnosis, incidence, clinical manifestations and the role of treatment and vaccination in management,” *Rev. Med. Microbiol.*, vol. 16, no. 3, pp. 79–89, 2005.
- [9] M. Wollstein, “the Bordet-Gengou Bacillus of Pertussis.,” *J. Exp. Med.*, vol. 11, no. 1, pp. 41–54, 1909.

- [10] S. Baron, *Medical Microbiology, 4th edition*, University of Texas Medical Branch at Galveston, Texas, 1996.
- [11] U. Heininger, K. Stehr, S. Schmitt-Grohé, C. Lorenz, R. Rost, P.D. Christenson, M. Uberall, "Clinical characteristics of illness caused by *Bordetella parapertussis* compared with illness caused by *Bordetella pertussis*," *Pediatr. Infect. Dis. J.*, vol. 13, no. 4, pp. 306-9, 1994.
- [12] H. Finger, "Bordetella," in S. Baron, *Medical Microbiology, 4th edition*, University of Texas Medical Branch at Galveston, Texas, 1996.
- [13] C. Loch, "Molecular aspects of *Bordetella pertussis* pathogenesis," *Int. Microbiol.*, vol. 2, no. 3, pp. 137-44, 1999.
- [14] D.L. Burns, "Subunit structure and enzymic activity of pertussis toxin," *Microbiol. Sci.*, vol. 5, no. 9, pp. 285-7, 1988.
- [15] S. Alonso, K. Pethe, N. Mielcarek, "Role of ADP-Ribosyltransferase Activity of Pertussis Toxin in Toxin-Adhesin Redundancy with Filamentous Hemagglutinin during *Bordetella pertussis* Infection," *Infect. Immun.*, vol. 69, no. 10, pp. 6038-6043, 2001.
- [16] M. Pittman, "Neurotoxicity of *Bordetella pertussis*," *Neurotoxicology*, vol. 7, no. 2, pp. 53-67, 1986.
- [17] I. Linhartová, L. Bumba, J. Mašín, M. Basler, R. Osička, J. Kamanová, K. Procházková, I. Adkins, J. Hejnová-Holubová, L. Sadílková, J. Morová, P. Sebo, "RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism," *FEMS microbiol. rev.*, vol. 34, no. 6, pp. 1076-112, 2010.
- [18] J. Vojtova, J. Kamanova, P. Sebo, "Bordetella adenylate cyclase toxin: a swift saboteur of host defense," *Curr. opin. microbiol.*, vol. 9, no. 1, pp. 69-75, Feb. 2006.

- [19] K. E. Walker, A. A. Weiss, "Characterization of the dermonecrotic toxin in members of the genus *Bordetella*," *Infect. Immun.*, vol. 62, no. 9, pp. 3817–3828, 1994.
- [20] T. Matsuzawa, A. Fukui, T. Kashimoto, K. Nagao, K. Oka, M. Miyake, Y. Horiguchi, "Bordetella dermonecrotic toxin undergoes proteolytic processing to be translocated from a dynamin-related endosome into the cytoplasm in an acidification-independent manner," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 4, pp. 2866–72, 2004.
- [21] L. N. Heiss, S. Moser, E. R. Unanue, W. E. Goldman, "Interleukin-1 is linked to the respiratory epithelial cytopathology of pertussis," *Infect. Immun.*, vol. 61, no. 8, pp. 3123–8, 1993.
- [22] G. Fedele, I. Celestino, F. Spensieri, L. Frasca, M. Nasso, M. Watanabe, "Lipooligosaccharide from *Bordetella pertussis* induces mature human monocyte-derived dendritic cells and drives a Th2 biased response," *Microbes. Infect.*, vol. 9, no. 7, pp. 855–63, 2007.
- [23] I. N. Emsley, P. G. McDermott, I. G. Charles, N. F. Fairweather, "Crystallographic characterization of pertactin, a membrane-associated protein from *Bordetella pertussis*," *J. Mol. Biol.*, vol. 235, no. 2, pp. 772–3, 1994.
- [24] R. J. Willems, C. Geuijen, H. G. van der Heide, M. Matheson, A. Robinson, L. F. Versluis, R. Ebberink, J. Theelen, "Isolation of a putative fimbrial adhesin from *Bordetella pertussis* and the identification of its gene," *Mol. Microbiol.*, vol. 9, no. 3, pp. 623–34, 1993.
- [25] C. Loch, P. Bertin, F. D. Menozzi, "The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesion produced by virulent *Bordetella* spp.," *Mol. Microbiol.*, vol. 9, no. 4, pp. 653–60, 1993.
- [26] D. Relman, M. Domenighini, E. Tuomanen, R. Rappuoli, S. Falkow, "Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: nucleotide sequence and crucial role in adherence," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 86, no. 8, pp. 2637–41, 1989.

- [27] A.M. Makhov, J.H. Hannah, M.J. Brennan, B.L. Trus, E. Kocsis, J.F. Conway, P.T. Wingfield, M.N. Simon, "Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. A bacterial adhesin formed as a 50-nm monomeric rigid rod based on a 19-residue repeat motif rich in beta strands and turns.," *J. Mol. Biol.*, vol. 241, no. 1, pp. 110–24, 1994.
- [28] E. Tuomanen , "Characterization of two adhesins of *Bordetella pertussis* for human ciliated respiratory-epithelial cells," *J. Infect. Dis.*, vol. 152, no. 1, pp. 118–25, 1985.
- [29] J. H. Hannah, F. D. Menozzi, G. Renauld, C. Locht, and M. J. Brennan, "Sulfated glycoconjugate receptors for the *Bordetella pertussis* adhesin filamentous hemagglutinin (FHA) and mapping of the heparin-binding domain on FHA.," *Infect. Immun.*, vol. 62, no. 11, pp. 5010–9, 1994.
- [30] B. Y. Ishibashi, S. Claus, and D. A. Relman, " *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin interacts with a leukocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18).," *J. Exp. Med.*, vol. 180, pp. 1225-1233, 1994.
- [31] B. Clantin, H. Hodak, E. Willery, C. Locht, F. Jacob-Dubuisson, V. Villeret, "The crystal structure of filamentous hemagglutinin secretion domain and its implications for the two-partner secretion pathway.," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 101, no. 16, pp. 6194–9, 2004.
- [32] F. Jacob-Dubuisson ,C. Locht, "Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins.," *Mol. Microbiol.*, vol. 40,no. 2, pp. 306–13, 2001.
- [33] J. Mazar and P. Cotter, "Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion.," *Mol. Microbiol.*, vol. 62, no. 3, pp. 641–54, 2006.
- [34] B. Clantin, A.S. Delattre, P. Rucktooa, N. Saint, A. C. Méli, C. Locht, F. Jacob-Dubuisson, V. Villeret, "Structure of the membrane protein FhaC: a member of the

- Omp85-TpsB transporter superfamily.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 317, no. 5840, pp. 957–61, 2007.
- [35] M. Chevalier , M. Moser, H.G. Koch, K.L. Schimz, E. Willery, C. Loch, F. Jacob-Dubuisson , "Membrane targeting of a bacterial virulence factor harbouring an extended signal peptide.," *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 8,no. 1, pp. 7–18, 2004.
 - [36] C. L. G. Renaud-Mongénie, J. Cornette, N. Mielcarek, F. D. Menozzi, "Distinct roles of the N-terminal and C-terminal precursor domains in the biogenesis of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin.," *J. Bacteriol.*, vol. 178, no. 4, pp. 1053–1060., 1996.
 - [37] E. Leininger, S. Bowen, G. Renaud-Mongénie, J. H. Rouse, F. D. Menozzi, C. Loch, I. Heron, and M. J. Brennan, "Immunodominant domains present on the *Bordetella pertussis* vaccine component filamentous hemagglutinin.," *J.Infect. Dis.*, vol. 175, no. 6, pp. 1423–31, 1997.
 - [38] S. Alonso, N. Reveneau, C. Loch, "Eighty-Kilodalton N-Terminal Moiety of *Bordetella pertussis* Filamentous Hemagglutinin: Adherence, Immunogenicity, and Protective Role," *Infect. Immun.*, vol. 70, no. 8, pp. 4142–4147., 2002.
 - [39] T. S. Rucker,F.M. Torti, "Recombinant ferritin: modulation of subunit stoichiometry in bacterial expression systems.," *Protein Eng.*, vol. 10, no. 8, pp. 967–73., 1997.
 - [40] M. R. Johnston K, A. Clements ,R.N. Venkataramani ,R.C. Trievel, "Coexpression of proteins in bacteria using T7-based expression plasmids: expression of heteromeric cell-cycle and transcriptional regulatory complexes.," *Protein Expr Purif.*, vol. 20, no. 3, pp. 435–43., 2000.

8.1. Seznam převzatých obrázků

1. <http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S1369527400001697-gr3.jpg>
(Aktuální ke dni 22.5.2013, Obr. 2.1., str. 13)
2. http://openi.nlm.nih.gov/imgs/rescaled512/3153263_toxins-02-01612-g005.png
(Aktuální ke dni 22.5.2013, Obr. 2.2., str. 14)
3. http://www.plospathogens.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.ppat.1000901.g008&representation=PNG_I
(Aktuální ke dni 22.5.2013, Obr. 2.3., str. 15)
4. <http://t1.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSaRVAU4SoxrA6PIhfQ9gewkqvL9CCooYoY86q6PqhTzoMNZSYx>
(Aktuální ke dni 22.5.2013, Obr. 2.4., str. 16)
5. http://www.biomin.net/uploads/RTEmagicC_Toxin-Risk-Management_Figure1_06.jpg.jpg
(Aktuální ke dni 22.5.2013, Obr. 2.5., str. 17)
6. A.M. Makhov, J.H. Hannah, M.J. Brennan, B.L. Trus, E. Kocsis, J.F. Conway, P.T. Wingfield, M.N. Simon, "Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. A bacterial adhesin formed as a 50-nm monomeric rigid rod based on a 19-residue repeat motif rich in beta strands and turns," *J. Mol. Biol.*, vol. 241, no. 1, pp. 110–24, 1994. (Aktuální ke dni 22.5.2013, Obr. 2.6., str. 18)
7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC395945/bin/zpq0160445430006.jpg>
(Aktuální ke dni 22.5.2013, Obr. 2.7., str. 19)
8. <http://www.esrf.eu/UsersAndScience/Publications/Highlights/2007/SB/fig-82.jpg>
(Aktuální ke dni 22.5.2013, Obr. 2.8., str. 20)
9. F. Jacob-Dubuisson, C. Buisine, "Amino-terminal maturation of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin," *Mol. Microbiol.*, vol. 19, no. 1, pp. 65-78, 1996
(Aktuální ke dni 22.5.2013, Obr. 2.9, str. 21)
10. J. Mazar and P. Cotter, "Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion," *Mol. Microbiol.*, vol. 62, no. 3, pp. 641–54, 2006. (Aktuální ke dni 22.5.2013, Obr. 2.10., str. 21)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka